

**Universidade do Minho**  
Escola de Ciências

Miguel Filipe Moreira Marques Ferreira

## **Paramagnetic gold nanoparticles for MRI and therapeutic applications**

Tese de Mestrado  
Mestrado em Química Medicinal

Trabalho efectuado sob a orientação do  
**Professor Doutor José Alberto Martins**

Outubro de 2009

**Autor:**

Miguel Filipe Moreira Marques Ferreira

Email: [miguelferreira@kanguru.pt](mailto:miguelferreira@kanguru.pt)

Tese de Mestrado em Química Medicina

**Título:** Paramagnetic gold nanoparticles for MRI and therapeutic applications

**Ano de publicação:** 2009

**Orientador:**

Doutor José Alberto Ribeiro Martins

Email: [jmartins@quimica.uminho.pt](mailto:jmartins@quimica.uminho.pt)

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE;

Universidade do Minho, 30/10/2009

Assinatura: \_\_\_\_\_

## Agradecimentos

Este espaço é dedicado a todos que, de alguma forma, contribuíram para que este trabalho fosse possível.

A primeira pessoa a quem eu quero agradecer é ao meu orientador, o Professor Doutor José Alberto Martins porque sem a sua grande ajuda, disponibilidade sempre manifestada e pelo seu empenho nada disto teria sido possível.

Ao Professor Doutor Carlos Geraldês pela oportunidade estimulante que me deu de trabalhar com o seu grupo de investigação e pelo incentivo e apoio prestados.

Gostaria ainda de agradecer ao Dr. André Martins, estudante de Doutoramento no Departamento de Bioquímica da Universidade de Coimbra, sob orientação do Professor Doutor Carlos Geraldês, pela determinação das propriedades relaxométricas do complexo  $\text{DO}_3\text{A-N-}\alpha\text{-aminopropionato}$ , e pela sua disponibilidade e apoio demonstrados nas minhas deslocações a Coimbra.

À Professora Doutora Eva Tóth pela caracterização relaxométrica (estudos de DRMN de  $^1\text{H}$  e de RMN de  $^{17}\text{O}$ ) do complexo  $\text{Gd}(\text{DO}_3\text{A-N-}\alpha\text{-aminopropionato})$ , realizada no seu laboratório, no Centre de Biophysique Moleculaire em Orleans, pelo estudante de Doutoramento André Martins.

À Professora Doutora Isabel Prata do Instituto de Ciências Nucleares Aplicadas à Saúde de Coimbra pelos estudos de biodistribuição realizados.

Aos funcionários do Departamento de Química, técnicos e administrativos, pelo apoio prestado. Em especial à Elisa e à Natércia pelas aquisições dos dados espectroscópicos e pelas análises de massa, respectivamente, sem as quais não seria possível avançar neste trabalho.

Aos meus colegas de laboratório o Arsénio, a Xana, o André, a Andreia e o Hélder por todo apoio e boa disposição que ajudaram a ultrapassar os momentos mais frustrantes com que me deparei durante este trabalho.

À minha irmã, pelo seu contínuo apoio e incentivo e por acreditar em mim. Aos meus pais, pelo permanente incentivo, apoio, carinho e compreensão que mais uma vez souberam transmitir e demonstrar e por tantas outras razões que seriam impossível enumerar aqui...

A todos o meu muito obrigado!



## RESUMO

A síntese de agentes quelantes bifuncionais do tipo poli(azacarboxilatos) contendo grupos pendentes para acoplamento a (bio)moléculas suscita um grande interesse na comunidade científica, pelas aplicações potenciais dos respectivos quelatos em imagiologia médica e para aplicações terapêuticas. O objectivo deste trabalho foi o desenvolvimento de vias sintéticas para a síntese de agentes quelantes funcionalizados com tiois, para preparação de nanopartículas de ouro decoradas com quelatos de  $Gd^{3+}$  como potenciais agentes de contraste para IRM. No decorrer deste trabalho foram sintetizados e caracterizados três novos agentes quelantes: DOTA-Lipoamida,  $DO_3A-N-\alpha$ -aminopropionato e  $DO_3A-N-\alpha$ -aminopropionato-Lipoamida. A síntese do ligando DOTA-Lipoamida foi realizada seguindo uma via desenvolvida anteriormente pelo nosso grupo de investigação. Para a síntese dos ligandos  $DO_3A-N-\alpha$ -aminopropionato e  $DO_3A-N-\alpha$ -aminopropionato-Lipoamida foi desenvolvida uma nova via sintética.

A dinâmica em solução dos complexos de iões Lantanídeo (III) ( $Ln = La, Sm$  e  $Eu$ ) do ligando  $DO_3A-N-\alpha$ -aminopropionato foi estudada por RMN de  $^1H$ . O estudo relaxométrico do complexo  $[Gd(DO_3A-N-\alpha\text{-aminopropionato})(H_2O)]$  foi realizado recorrendo à técnica de dispersão de relaxação magnética nuclear (DRMN) de  $^1H$  e através de estudos de Ressonância Magnética Nuclear de  $^{17}O$ . A análise simultânea dos dados obtidos pela teoria de Solomon-Bloembergen-Morgan permitiu determinar os parâmetros que governam a relaxividade do complexo. O quelato  $[Gd(DO_3A-N-\alpha\text{-aminopropionato})(H_2O)]$  apresenta uma velocidade de troca acelerada de água na esfera interna, no intervalo óptimo para atingir altas relaxividades a campos intermédios. Para além disso, o ligando (e o complexo) têm um grupo amina pendente no braço propionato, passível de ser usado para conjugação de (bio)moléculas.

A via sintética usada para a preparação do ligando  $DO_3A-N-\alpha$ -aminopropionato foi estendida para a preparação do conjugado com ácido lipóico,  $DO_3A-N-\alpha$ -aminopropionato-Lipoamida. O uso do tiol (dissulfeto) ácido lipóico revelou-se problemático devido à tendência do conjugado para dimerizar/polimerizar em condições ácidas. Outras reacções secundárias durante a síntese dificultaram

também a obtenção de conjugados puros. Esta via sintética necessita de optimização, embora seja muito promissora para a preparação de conjugados de agentes quelantes como agentes de contraste de alta relaxividade para IRM.

As nanopartículas funcionalizadas despertam actualmente um grande interesse devido às suas aplicações potenciais como agentes para diagnóstico molecular e terapia e como ferramentas em biotecnologia. Os ligandos DOTA-Lipoamida e DO<sub>3</sub>A-*N*- $\alpha$ -aminopropionato-Lipoamida foram utilizados para a preparação de nanopartículas de ouro. Obtiveram-se nanopartículas estabilizadas com ambos os ligandos. A complexação de iões lantanídeo(III) pelas nanopartículas funcionalizadas, com ambos os ligandos, foi optimizada. As nanopartículas funcionalizadas com o agente quelante DO<sub>3</sub>A-*N*- $\alpha$ -aminopropionato-Lipoamida permitem uma complexação completa enquanto que nanopartículas funcionalizadas com o ligando DOTA-Lipoamida apenas permitem complexação parcial. As nanopartículas foram caracterizadas por UV-Vis, Dynamic Light Scattering (DLS) e por estudos de potencial Zeta. Foram ainda realizados estudos de biodistribuição das nanopartículas funcionalizadas com DO<sub>3</sub>A-*N*- $\alpha$ -aminopropionato-Lipoamida através de marcação com o isótopo radioactivo <sup>153</sup>Sm<sup>3+</sup>.

## Abstract

The synthesis of bifunctional poly(azacarboxylate) metal chelators bearing functional groups for coupling to biomolecules is a very active research area due to the potential applications of metal chelates in medical imaging and for therapeutic applications. The aim of this work was the development of synthetic routes for obtaining metal chelators functionalized with thiols, for the preparation of nanoparticles decorated with  $Gd^{3+}$  metal chelates as contrast agents for Magnetic Resonance Imaging (MRI). During this research, three new metal chelators were synthesised and characterised, which were named DOTA-Lipoamida,  $DO_3A-N-\alpha$ -aminopropionato e  $DO_3A-N-\alpha$ -aminopropionato-Lipoamida. For the preparation of the DOTA-Lipoamida metal chelator a synthesis previously developed at our research group was used. A new synthetic sequence was developed for the synthesis of the  $DO_3A-N-\alpha$ -aminopropionato e  $DO_3A-N-\alpha$ -aminopropionato-Lipoamida metal chelators. The solution dynamics of the  $DO_3A-N-\alpha$ -aminopropionato  $Ln^{3+}$  chelates ( $Ln = La, Sm, Eu$ ) was studied by  $^1H$  NMR. The relaxometric characterisation of the  $[Gd(DO_3A-N-\alpha$ -aminopropionato)( $H_2O$ )] chelate was performed by  $^1H$  Nuclear Magnetic Relaxation Dispersion and  $^{17}O$  Nuclear Magnetic Resonance studies. The simultaneous fitting of the  $^1H$  NMRD and  $^{17}O$  NMR data to the Solomon-Bloembergen-Morgan theory allowed to determine the parameters that govern the relaxivity. The  $[Gd(DO_3A-N-\alpha$ -aminopropionato)( $H_2O$ )] chelate displays an accelerated water exchange, in the optimal range for achieving high relaxivities. Moreover, the ligand bears a pendant amine group on the propionate arm for conjugation to (bio)molecules. The synthetic pathway used for the preparation of the  $DO_3A-N-\alpha$ -aminopropionato ligand was extended for the synthesis of its lipoic acid conjugate:  $DO_3A-N-\alpha$ -aminopropionato-Lipoamida. The use of the disulfide (thiol) Lipoic acid revealed very difficult due to its tendency for the formation of dimers and/or polymers in acidic conditions. Other secondary reactions during the synthesis lead to impure conjugates. Although this synthetic pathway needs to be optimized, it is very promising for the synthesis of conjugates of  $DO_3A-N-\alpha$ -aminopropionato-Lipoamida as high relaxivity contrast agents.

Functionalised nanoparticles attract a great research interest due to their potential applications as molecular diagnostics and for therapeutic applications. The DOTA-Lipoamida e DO<sub>3</sub>A-*N*- $\alpha$ -aminopropionato-Lipoamida ligands were used successfully for the preparation of gold nanoparticles. The loading of the nanoparticles with Ln<sup>3+</sup> ions was optimised. The nanoparticles functionalised with the metal chelator DO<sub>3</sub>A-*N*- $\alpha$ -aminopropionato-Lipoamida can be fully loaded with Ln<sup>3+</sup> ions, while only a partial loading of the nanoparticles functionalised with the metal chelator was possible. The nanoparticles were characterised by UV-Vis, Dynamic Light Scattering (DLS) and by Zeta potential measurements. Biodistribution studies were performed with nanoparticles functionalized with DO<sub>3</sub>A-*N*- $\alpha$ -aminopropionato-Lipoamida labelled with <sup>153</sup>Sm<sup>3+</sup>.



Índice	
<i>Agradecimentos</i>	III
<i>Resumo</i>	V
<i>Abstract</i>	VII
<i>Índice</i>	IX
<i>Capítulo 1 - Agentes de contraste em IRM</i>	1
1.1 Introdução	2
1.2 Relaxação Paramagnética	4
1.3 Agentes de contraste Clínicos	8
1.3.1 Agentes extracelulares	9
1.3.2 Blood Pool agentes	11
1.3.3 Agentes hepatobiliares	13
1.4 Referências	15
 <i>Capítulo 2 - Gd(DO<sub>3</sub>A-<i>N</i>-<math>\alpha</math>-aminopropionato): um novo sintão para a síntese de agentes de contraste endereçados de alta relaxividade para IRM</i>	 19
2.1 Resumo	20
2.2 Introdução	21
2.3 Resultados e discussão	24
2.3.1 Design e síntese do agente quelante DO <sub>3</sub> A- <i>N</i> - $\alpha$ -aminopropionato	24
2.3.2 Estudos da dinâmica em solução dos complexos [Ln(DO <sub>3</sub> A- <i>N</i> - $\alpha$ -aminopropionato)(H <sub>2</sub> O)] <sup>-</sup> , Ln <sup>3+</sup> (La, Sm, Eu) por RMN de <sup>1</sup> H	27
2.3.3 Estudos de transmetalção com Zn <sup>2+</sup>	31
2.3.4 RMN de <sup>17</sup> O e experiências de DRMN de <sup>1</sup> H	32
2.4 Conclusão	36
2.5 Secção experimental	37
2.5.1 Materiais e equipamentos	37
2.5.2 Procedimentos experimentais	37
2.5.3 Estudos de RMN de <sup>17</sup> O e de DRMN de <sup>1</sup> H	39

2.6 Referências	42
<i>Capítulo 3 - Nanopartículas de ouro funcionalizadas com agentes quelantes: síntese e caracterização</i>	45
3.1 Resumo	46
3.2 Introdução	47
3.3 Resultados e discussão	52
3.3.1 Design e síntese do agente quelante DOTA-Lipoamida	53
3.3.2 Design e síntese do agente quelante DO <sub>3</sub> A- <i>N</i> - $\alpha$ -aminopropionato-Lipoamida	56
3.3.3 Preparação de nanopartículas de ouro funcionalizadas com o Ligando DOTA-Lipoamida pelo método de substituição: estudos de UV-VIs	60
3.3.4 Preparação de nanopartículas de ouro funcionalizadas com o Ligando DOTA-Lipoamida pelo método de substituição: estudo relaxométrico	63
3.3.5 Síntese de nanopartículas de ouro funcionalizadas <i>via</i> redução do Au <sup>3+</sup> na presença do agente quelante DOTA-Lipoamida	66
3.3.6 Síntese de nanopartículas de ouro funcionalizadas <i>via</i> redução do Au <sup>3+</sup> na presença do agente quelante DO <sub>3</sub> A- <i>N</i> - $\alpha$ -aminopropionato-Lipoamida	72
3.3.7 Estudos de complexação de nanopartículas de ouro funcionalizadas com o ligando DOTA-Lipoamida	75
3.3.8 Estudos de complexação de nanopartículas de ouro funcionalizadas com o ligando DO <sub>3</sub> A- <i>N</i> - $\alpha$ -aminopropionato-Lipoamida	83
3.3.9 Biodistribuição de nanopartículas funcionalizadas com DO <sub>3</sub> A- <i>N</i> - $\alpha$ -aminopropionato-Lipoamida e marcadas com <sup>153</sup> Sm <sup>3+</sup>	86
3.4 Conclusão	88
3.5 Secção experimental	90
3.5.1 Materiais e equipamento	90

3.5.2 Procedimentos experimentais	91
3.5.3 Estudos de caracterização das nanopartículas	93
3.6 Referências	97



# 1

**Agentes de Contraste em IRM**

## 1.1 – Introdução

A imagiologia por ressonância magnética (IRM) e a espectroscopia de ressonância magnética nuclear são baseados no efeito de ressonância magnética nuclear (RMN). Este fenómeno foi descoberto em 1946 por dois grupos de investigação distintos, Bloch *et al.* da universidade de Stanford [1] e Purcell *et al.* da universidade de Harvard [2]. A IRM não expõe o paciente a radiação ionizante uma vez que se baseia na interacção de campos magnéticos e de radiofrequências com os prótons da água dos tecidos. A intensidade das imagens obtidas em IRM depende de vários parâmetros característicos do estado de organização dos tecidos biológicos [3].

A IRM resulta das propriedades magnéticas dos prótons,  $^1\text{H}$ , um dos núclídeos mais abundantes nos tecidos do corpo humano. Imagens anatómicas detalhadas são obtidas expondo os núcleos  $^1\text{H}$  a um campo magnético externo e a pulsos de excitação na forma de ondas de rádio (oscilação electromagnética do campo). A informação espacial sobre a distribuição dos núcleos magnéticos no corpo, é obtida ao expô-los a um campo magnético não homogéneo, que varia linearmente ao longo do corpo, formando o chamado *gradiente de campo magnético*. O gradiente de campo magnético provoca nos núcleos um efeito idêntico ao da *precessão* para diferentes frequências de *Larmour*, as quais são proporcionais à intensidade do campo. Quanto maior for a intensidade do gradiente maior é o intervalo de frequências. Daqui resultam, as características de contraste entre as várias estruturas anatómicas do corpo humano obtidas por IRM [4,5].

O termo *contraste* define a diferença relativa em intensidade entre duas regiões adjacentes dentro de um objecto analisado numa escala de cor cinza. A diferença numérica entre as intensidades dos *pixels* ou *voxels* cria o contraste. O contraste de uma imagem de IRM é o resultado de várias contribuições intrínsecas (tempos de relaxação longitudinal e transversal,  $T_1$  e  $T_2$ , respectivamente,  $T_2^*$ , densidade de prótons, fluxo, difusão e perfusão) e extrínsecas (tipo de sequência de pulsos, intensidade do campo magnético).

Mesmo que o contraste intrínseco em IRM seja muito mais flexível do que noutras técnicas de imagem clínica, o diagnóstico de diversas patologias pode requer a administração de Agentes de Contraste (AC), para aumentar o contraste entre tecidos normais de tecidos doentes. O aumento da intensidade do sinal produzido em IRM por

um agente de contraste depende da sua relaxividade ( $r_1$  e  $r_2$ ), definida como o aumento da velocidade de relaxação ( $R_1 = 1/T_1$ ;  $R_2 = 1/T_2$ ) produzida por 1 mmol por litro de AC (expressa em  $\text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$ ) (1). A relaxividade,  $r_1$  e  $r_2$ , são os parâmetros físico-químicos mais importantes no desenvolvimento de agentes de contraste eficazes [6]. A relaxividade de um agente de contraste depende essencialmente do tamanho e da estrutura química do complexo/conjugado e da acessibilidade das moléculas de água ao centro magnético (1).

$$R_{i(obs)} = \frac{1}{T_{i(obs)}} = \frac{1}{T_{i(diam)}} + r_i C; \quad i = 1 \text{ ou } 2 \quad (1)$$

Onde:

$R_{i(obs)}$  e  $1/T_{i(obs)}$  = velocidade de relaxação do sistema ( $\text{s}^{-1}$ )

$T_{i(diam)}$  = tempo de relaxação antes da adição do AC

C = concentração do centro paramagnético ( $\text{mmol L}^{-1}$ )

$r_i$  = relaxividade ( $\text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$ )

A concentração tecidual de AC não é o único parâmetro que determina a eficiência de um agente de contraste. A distribuição do AC dentro do *voxel* da imagem, a densidade de prótons e difusão, bem como o ambiente químico, contribuem para a melhoria do sinal obtido.

Os agentes de contraste para IRM devem obedecer a vários requisitos para poderem ser usados em aplicações clínicas: relaxação e efeitos de sensibilidade adequados, tolerância, segurança, baixa toxicidade, estabilidade, biodistribuição ideal e eliminação. A maioria dos AC para IRM não são específicos para patologias, mas são sim específicos para alterações patológicas. Os AC com aplicação clínica geral podem ser classificados como agentes extracelulares, *blood-pool agents*, agentes hepatobiliares e outros que permitem melhorar a imagem de gânglios linfáticos, do fígado e tumores.

## 1.2- Relaxação Paramagnética

Foram desenvolvidos modelos quantitativos teóricos para expressar a relaxação de centros paramagnéticos. A eficiência dos AC está relacionada com movimentos moleculares e com propriedades intrínsecas dos núcleos (momento magnético, razão giromagnética, spin). A relaxação paramagnética é explicada por dois mecanismos: contribuições de esfera interna (IS) e de esfera externa (OS). A relaxação de esfera interna (Figura 1.1) é um processo de troca química, durante o qual uma ou várias moléculas de água deixam a primeira esfera de coordenação electrónica do centro paramagnético e são substituídas por outras moléculas (tempo de residência  $\tau_M$ ). Este mecanismo permite a propagação do efeito paramagnético para a totalidade do solvente (*bulk water*). O modelo de esfera interna IS é adequadamente descrito pela teoria de Solomon-Bloembergen-Morgan [7].

O tempo de relaxação dos prótons da água na primeira esfera de coordenação do metal é designado por  $T_{1M}$ . A contribuição do mecanismo de esfera interna para a relaxividade é dada por:

$$R_1^{IS} = fq \frac{1}{T_{1M} + \tau_M} \quad (2)$$

Onde:

$f$  = concentração relativa do centro paramagnético e das moléculas de água

$q$  = número de moléculas de água na primeira esfera de coordenação do metal

$\tau_M$  = tempo de residência da molécula de água coordenada

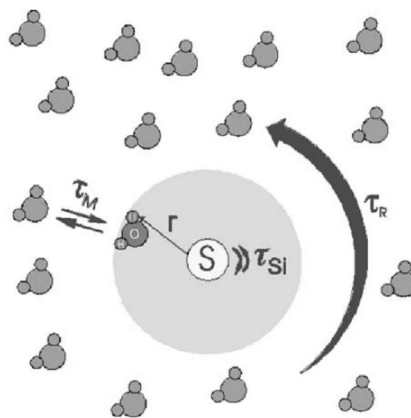


Figura 1.1- Representação esquemática do mecanismo de relaxação de esfera interna [9].



O cálculo de  $T_{1M}$  é baseado num modelo que inclui a amplitude da interacção do campo magnético, a sua modulação temporal e o efeito da intensidade do campo magnético externo (3).

$$\frac{1}{T_{1M}} = \frac{2}{15} \left( \frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \gamma_H^2 \gamma_S^2 \hbar^2 S(S+1) \frac{1}{r^6} \left[ \frac{7\tau_{c2}}{1 + (\omega_H \tau_{c1})^2} + \frac{3\tau_{c1}}{1 + (\omega_H \tau_{c1})^2} \right] \quad (3)$$

$$\text{Onde } \frac{1}{\tau_{ci}} = \frac{1}{\tau_R} + \frac{1}{\tau_M} + \frac{1}{\tau_{si}} \quad (4)$$

$$\frac{1}{\tau_{si}} = \frac{1}{5\tau_{SO}} \left[ \frac{1}{1 + \omega_S^2 \tau_V^2} + \frac{4}{1 + 4\omega_S^2 \tau_V^2} \right] \quad (5)$$

$$\frac{1}{\tau_{s2}} = \frac{1}{10\tau_{SO}} \left[ 3 + \frac{5}{1 + \omega_S^2 \tau_V^2} + \frac{2}{1 + 4\omega_S^2 \tau_V^2} \right] \quad (6)$$

Onde:

$\gamma_S$  e  $\gamma_H$  = razões giromagnéticas do electrão (S) e do protão ( $^1H$ ), respectivamente

$\omega_{S,H}$  = frequência angular do electrão e do protão

$r$  = distância entre os protões da água coordenada e os spins electrónicos desemparelhados

$\tau_{c1,2}$  = tempos de correlação modular, definidas por (4)

Onde:

$\tau_R$  = tempo de correlação rotacional do complexo

$\tau_{s1,2}$  = velocidade de relaxação longitudinal e transversal do electrão

Estes últimos parâmetros são dependentes de campo (5 e 6).

$\tau_{SO}$  = valor de  $\tau_{s1,2}$  a campo = zero

$\tau_V$  = tempo de correlação característica da relaxação electrónica

A segunda contribuição para a relaxação paramagnética é a relaxação de esfera externa (Figura 1.2). É explicada pela interacção dipolar de longa distância entre o spin do centro paramagnético e o spin nuclear das moléculas de água.

Este mecanismo é modulado pelo tempo de correlação translacional ( $\tau_D$ ), o qual tem em conta a relação entre a difusão (D) do centro paramagnético e das moléculas

do solvente, bem como a sua distância de aproximação máxima (d) (7). O modelo de esfera externa foi proposto por Freed em 1978 [8].

$$\tau_D = d^2/D \quad (7)$$

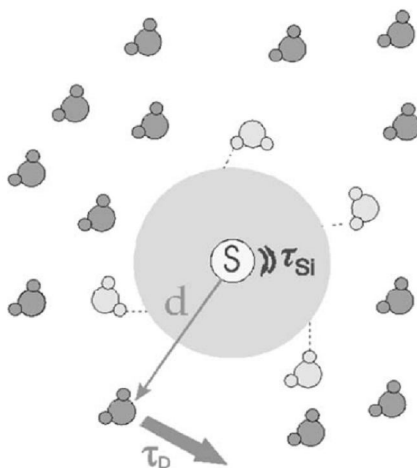


Figura 1.2- Representação esquemática do mecanismo de relaxação de esfera externa [8].

A complexidade das equações que descrevem a velocidade de relaxação, reflecte-se no número de parâmetros que descrevem a relaxação de esfera interna e de esfera externa - oito parâmetros:  $\tau_M$ ,  $q$ ,  $\tau_R$ ,  $D$ ,  $R$ ,  $d$ ,  $\tau_V$ ,  $\tau_{S0}$ ). A determinação de alguns destes parâmetros, por métodos independentes, facilita o ajuste teórico dos perfis de dispersão de relaxação magnética nuclear (DRMN) de  $^1\text{H}$  (Figura 1.3), o qual fornece a maioria dos parâmetros. O perfil de DRMN caracteriza a eficiência do AC, em diferentes campos magnéticos [9,10].

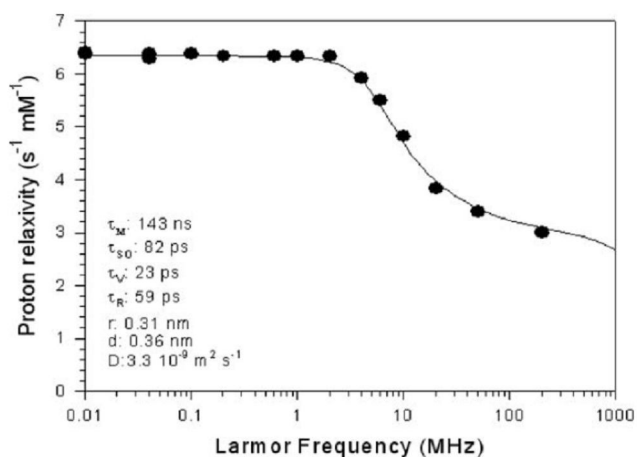


Figura 1.3- Perfil de DRMN de  $^1\text{H}$  do complexo Gd(DTPA) a 310K [11].

**Tempo de correlação rotacional ( $\tau_R$ ):** O tempo de correlação rotacional caracteriza a reorientação do vector entre o ião  $Gd^{3+}$  e os protões da molécula de água coordenada. Geralmente, para complexos de baixo peso molecular,  $\tau_R$  limita a relaxividade do complexo a campo intermédio/alto.

O tempo de correlação rotacional pode ser obtido por vários métodos, tais como: (1) análise do tempo de relaxação longitudinal  $T_1$ , em complexos de  $Gd^{3+}$ , por RMN de  $^{17}O$  [12,13], (2) medição da taxa de relaxação longitudinal em RMN de  $^{13}C$  [14], (3) espectroscopia de fluorescência polarizada [15], e (4) RMN de  $^2H$  em complexos de lantânio [16].

**Tempos de relaxação electrónica ( $\tau_{s1}$  e  $\tau_{s2}$ ):** Os tempos de relaxação electrónica longitudinal e transversal ( $\tau_{s1}$  e  $\tau_{s2}$ , respectivamente) descrevem o processo de retorno ao equilíbrio de electrões excitados durante as transições entre os níveis electrónicos do centro paramagnético. Essas transições produzem flutuações que permitem a relaxação dos protões.

**Número de moléculas de água coordenadas ( $q$ ):** O número de moléculas de água coordenadas influencia fortemente a contribuição de esfera interna para o processo de relaxação. De acordo com a equação 2 a relaxividade é directamente proporcional ao número de moléculas de água na primeira esfera de coordenação. A maioria dos complexos de  $Gd^{3+}$  em uso clínico tem  $q=1$ . O valor de  $q$  pode ser determinado por análise de raios-X ou por difracção de neutrões no estado sólido, ou em solução, por análise de fluorescência (desvio induzido por lantanídeos, LIS) de complexos de  $Eu^{3+}$  ou  $Yb^{3+}$ , ou por RMN de  $^{17}O$ .

**Distância Protão-metal ( $r$ ):** Na presença de centros paramagnéticos, a contribuição de esfera interna depende de interacções dipolares. A eficiência do mecanismo dipolar é proporcional a  $1/r^6$ , onde  $r$  é a distância entre o metal e os protões da molécula de água coordenada, pelo que, alterações pequenas deste parâmetro podem ter um impacto muito importante na relaxividade dos complexos.

**Tempo de residência da água coordenada ( $\tau_M$ ):** O mecanismo de relaxação de esfera interna é baseado na troca de água entre as moléculas de água directamente coordenadas ao metal e as moléculas de água da solução (*bulk water*) em torno do complexo. Consequentemente, a velocidade de troca de água ( $k_{ex} = 1/\tau_M$ ) é um parâmetro essencial para a transmissão do paramagnetismo do centro metálico para as moléculas de água do meio. A influência de factores, tal como a estrutura e a carga dos complexos na velocidade de troca, foram explorados no design de complexos com velocidade de troca acelerada [12,13,17].

### 1.3- Agentes de contraste em uso Clínico

Após a introdução pioneira de quelatos paramagnéticos de  $Mn^{2+}$  como agentes de contraste, por Lauterbur *et al.* [18], os quelatos de  $Gd^{3+}$  são actualmente os AC mais utilizados em aplicações clínicas. As propriedades magnéticas do ião  $Gd^{3+}$ , possui sete electrões desemparelhados,  $4f^7$ , e um tempo de relaxação electrónica longo, fazem dele o ião paramagnético preferido para aplicações em IRM [19]. Os quelatos paramagnéticos aumentam o contraste da imagem através da redução selectiva do tempo de relaxação longitudinal,  $T_1$ , dos prótons da água nos tecidos. A eficiência de um AC é medida pela respectiva relaxividade: o aumento selectivo da velocidade de relaxação das moléculas de água numa solução 1 mM de complexo [20]. A complexação de iões  $Gd^{3+}$  com ligandos do tipo poli(aminocarboxilatos) produz, em geral, complexos com estabilidade cinética e termodinâmica suficiente para evitar a libertação de metal, tóxico na forma livre, no ambiente fisiológico. Por outro lado, o design de ligandos orgânicos permite fazer o endereçamento de complexos para receptores celulares específicos e melhorar as propriedades farmacocinéticas dos complexos [19]. O número de moléculas de água coordenadas directamente ao centro paramagnético é determinado pela *denticidade* do ligando. Tentativas para aumentar o número de moléculas de água na primeira esfera de coordenação do metal à custa da diminuição da *denticidade* do ligando comprometem geralmente a estabilidade cinética e termodinâmica dos quelatos e as potenciais aplicações *in vivo* [20]. Os

Agentes de Contraste paramagnéticos de baixo peso molecular têm efeitos semelhantes em  $R_1$  e  $R_2$ , mas como o valor de  $R_1$  nos tecidos é muito inferior a  $R_2$ , o efeito predominante em doses baixas é a diminuição de  $T_1$  (e o aumento de  $R_1$ ). Assim, os órgãos onde se distribuem estes agentes ficam mais brilhantes (contraste positivo) em IRM.

Os complexos Gd(DTPA) e Gd(DOTA) são caracterizados pela sua excepcional estabilidade cinética e termodinâmica, baixa toxicidade e alta tolerância. Contudo, a sua alta osmolaridade, resultante da carga global -2 e -1, respectivamente para os complexos de Gd(DTPA) e Gd(DOTA), é desvantajosa para aplicações *in vivo* [21]. Neste contexto, dois derivados não iónicos, Gd(DTPA-BMA) [22] e Gd(HPDO<sub>3</sub>A) [23] foram desenvolvidos e continuam em uso clínico. Mais recentemente, outro complexo paramagnético neutro, Gd(DO<sub>3</sub>A-butrol), [24,25,26] entrou em uso clínico como AC extracelular. O design de AC específicos para o fígado, Gd(BOPTA) [27] e Gd(EOB-DTPA), [17,28] com alta captação hepática e eliminação hepatobiliar, teve um grande impacto no diagnóstico e prognóstico de doenças hepáticas, especialmente no cancro de fígado.

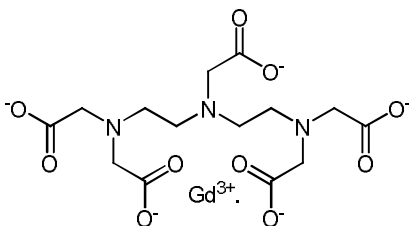
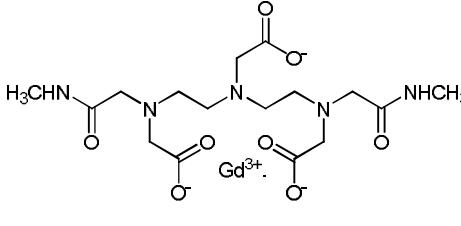
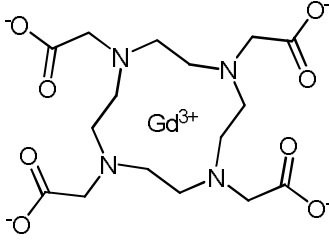
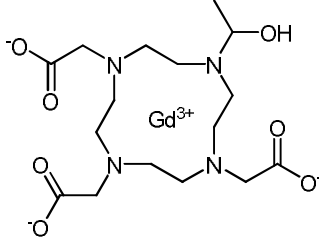
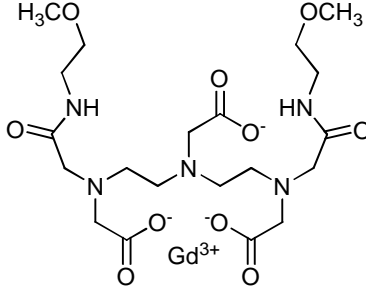
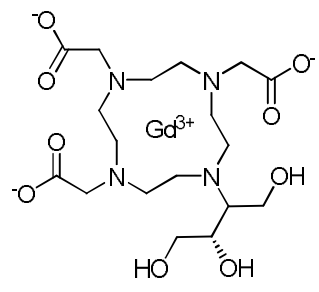
Actualmente, os agentes de contraste positivo são divididos em três categorias: agentes extracelulares, *blood-pool agents* e agentes hepatobiliares.

### **1.3.1- Agentes extracelulares**

Os Agentes de Contraste mais utilizados em IRM são agentes extracelulares: tipicamente complexos de baixo peso molecular e alta hidrofiliabilidade, que se distribuem rapidamente pelo plasma sanguíneo e pelos espaços intersticiais, e são excretados rapidamente por via renal. Os Agentes extracelulares são usados clinicamente para a detecção de tumores cerebrais, e noutras condições em que a barreira hemato-encefálica está comprometida (Tabela 1.1). O primeiro AC aprovado para IRM em seres humanos foi o complexo aniónico Gd(DTPA)- Magnevist (Schering, Berlim, Alemanha), a qual continua ainda a ser usado. [29,30]. Os efeitos secundários desta classe de AC para IRM (dores de cabeça, náuseas, gosto metálico) são minimizados pela sua rápida excreção renal, a qual minimiza a exposição celular e a sua potencial internalização por endocitose. Estes Agentes de Contraste são em grande parte excretados após oxidação ou conjugação [31]. A possibilidade de

desmetalação e/ou transmetalação *in vivo* por íons metálicos endógenos, principalmente  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Ca}^{2+}$ , é um factor determinante no design de novos agentes quelantes devido à toxicidade, tanto do íon  $\text{Gd}^{3+}$  como do ligando livre [32].

Tabela 1.1- Estrutura e relaxividade de alguns agentes de contraste extracelulares usados correntemente em IRM. [29,31,32,33,35,36]

Agentes de Contraste Extracelulares		
Agente de Contraste	 <p>Gd(DTPA) - Magnevist®</p>	 <p>Gd(DTPA-BMA) - Omniscan®</p>
Relaxividade ( $\text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$ )	$r_1 = 3.3$ $r_2 = 3.9$	$r_1 = 3.3$ $r_2 = 3.6$
Agente de Contraste	 <p>Gd(DOTA) - Dotarem®</p>	 <p>Gd(HPDO<sub>3</sub>A) - ProHance®</p>
Relaxividade ( $\text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$ )	$r_1 = 2.9$ $r_2 = 3.2$	$r_1 = 2.9$ $r_2 = 3.2$
Complexo	 <p>Gd(DTPA-BMEA) - Optimark®</p>	 <p>Gd(DO<sub>3</sub>A-butrol) - Gadovist®</p>
Relaxividade ( $\text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$ )	$r_1 = 3.8$ $r_2 = 4.2$	$r_1 = 3.3$ $r_2 = 3.9$

De uma forma geral, os quelatos de  $\text{Gd}^{3+}$  com ligandos de cadeia aberta, por exemplo Gd(DTPA), são menos estáveis do ponto de vista cinético e termodinâmico,

do que quelatos de ligandos macrocíclicos, por exemplo, Gd(DOTA). Os quelatos com ligandos do tipo DTPA-bisamida, por exemplo Gd(DTPA-BMA), são ainda menos estáveis. A dissociação *in vivo*, pode resultar da interacção do quelato com moléculas endógenas ou de processos espontâneos. A interacção biológica pode estar relacionada com o tamanho, forma, carga, ou lipofilicidade do quelato, enquanto que a termodinâmica e cinética do metal-ligando é governada por processos espontâneos [33,34,35]. A descoberta, em 2006, de uma reacção adversa, Fibrose Sistémica Nefrogénica (NSF), associada com o uso repetido do AC Omniscan® em indivíduos com insuficiência renal, veio expor de uma forma dramática as limitações dos AC do tipo Gd(DTPA-bisamida) para uso humano [36].

### **1.3.2- Blood Pool agentes**

Angiografia por ressonância magnética (ARM) é uma técnica de imagiologia clínica utilizada para visualizar o compartimento vascular e diagnosticar patologias caracterizados por lesões vasculares e diminuição do fluxo sanguíneo: aterosclerose, embolia, ferimentos traumáticos, úlceras, doenças infecciosas, tumores. Ainda que o sistema vascular possa ser visualizado por ARM sem qualquer AC exógeno, o desenvolvimento de Agentes de Contraste específicos para ARM tem melhorado muito o valor desta técnica clínica [37].

Os Agentes de Contraste para ARM devem associar uma relaxividade elevada a um tempo longo de permanência vascular [38]. A obtenção de relaxividades elevadas pode ser feita pela optimização simultânea do tempo de correlação rotacional,  $\tau_R$ , e da velocidade de troca de água,  $k_{ex}$ , na esfera interna de coordenação [39]. Um tempo prolongado de retenção vascular e um tempo de correlação rotacional óptimo, para atingir altas relaxividades, são geralmente conseguidos com Agentes de Contraste coloidais (lipossomas, micelas, nanopartículas) [40], ou macromoleculares (polímeros e (bio)conjugados)) [41,42] e também pela associação reversível de Agentes de Contraste monoméricos a proteínas plasmáticas, usualmente Albumina Sérica [43,44].

As preocupações relativas à segurança e as vias sintéticas elaboradas restringem o número de AC em desenvolvimento para aplicação potencial em ARM (Tabela 1.2). Os AC coloidais são retidos pelos órgãos do sistema reticuloendotelial, (RES) fígado e baço. Por outro lado, um tempo de retenção demasiado longo de

agentes macromoleculares no compartimento sanguíneo, pode originar toxicidade. Imunogenicidade, toxicidade cardíaca, e retenção prolongada no fígado e ossos foram identificados com quelatos conjugados a albumina [45].

Tabela 1.2- Estrutura e relaxividade de agentes de contraste *blood-pool* aprovados para uso comercial, Vasovist®, e em testes clínicos de fase III, Vistarem® [46,47,48].

Agentes de Contraste <i>Blood-Pool</i>		
Agente de Contraste	<p>Gd(MS-325) - Vasovist®</p>	<p>R =</p> <p>Gd(P729) - Vistarem ®</p>
Relaxividade ( $s^{-1} \text{ mM}^{-1}$ )	$r_1 = 5.2$	$r_1 = 42$

Recentemente o quelato de baixo peso molecular Gd(MS-325) (957 Da) foi lançado no mercado sob o nome comercial Vasovist®. Este quelato associa-se fortemente de forma reversível à Albumina Sérica Humana (HSA) após injeção, tornando-se assim um complexo macromolecular (68 KDa na forma ligada) com distribuição no compartimento vascular. O equilíbrio entre a forma livre e a forma ligada à Albumina Sérica permite a excreção renal do complexo. [11,46].

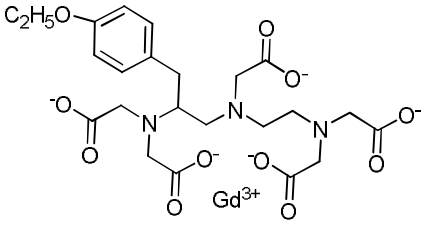
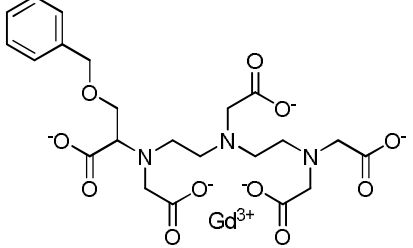
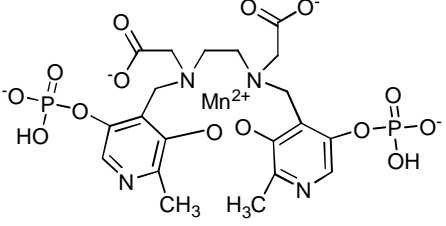
O agente de contraste P792 usa uma estratégia diferente, com potenciais benefícios clínicos, para a imagem do compartimento vascular. Trata-se de um complexo, com tamanho intermédio (MW= 6.47 kDa), baseado no núcleo Gd(DOTA) conjugado a grupos hidrofílicos volumosos para garantir biocompatibilidade. É rapidamente excretado, principalmente por via renal, não se liga à Albumina Sérica e não atravessa a barreira hemato-encefálica [47,48].



### **1.2.3- Agentes hepatobiliares**

Os AC extracelulares, embora possam melhorar o diagnóstico diferencial, não são específicos para imagem do fígado: distribuem-se rapidamente no espaço intersticial e não atravessam as membranas plasmáticas. Os Agentes de Contraste utilizados para IRM do fígado foram desenhados para melhorar a discriminação e diagnóstico de lesões hepáticas. Captação (internalização) pelos hepatócitos e excreção biliar são os requisitos fundamentais para o desenho de um AC hepatobiliar. Os únicos AC hepatobiliares aprovados para uso clínico são mangafodipir trisodium (Mn-DPDP- Teslascan®) e gadobenate dimeglumine (Gd(BOPTA) – MultiHance®). O ácido gadoxético (Gd(EOB-DTPA) – Primovist®, previamente chamado de Eovist®) está em fase III de testes clínicos nos E.U.A., tendo sido já aprovado para uso clínico na Europa (Tabela 1.3). A melhoria da imagem produzida pelo uso de agentes de contraste depende da (hiper)vascularização dos tumores, durante a fase de distribuição do Agente de Contraste e, numa fase posterior, da internalização selectiva de alguns dos Agentes de Contrastes hepatobiliares pelas células cancerígenas [49,50].

Tabela 1.3- Propriedades dos agentes de contraste hepatobiliares aprovados para uso clínico ou em fase III de ensaios clínicos [49,50].

Agentes de contraste hepatobiliares		
Agente de Contraste	 Gd(EOB-DTPA) - Eovist®	 Gd(BOPTA) - MultiHance®
Relaxividade (s <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> )	$r_1 = 4.9$	$r_1 = 4.0$
Agente de Contraste	 Mn(DPDP) – Teslascan®	
Relaxividade (s <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> )	$R_1 = 2.8$	

A semelhança química do complexo Mn(DPDP) com a vitamina B6, DPDP (DPDP= (N,N'-dipiridoxiletilenodiamina-N,N'-diacetato-5,5'-bisfosfato) é um análogo da vitamina B6, contribui para sua captação pelos hepatócitos. O complexo Mn(DPDP) é metabolizado *in vivo* por desfosforilação e transmetalção por Zn<sup>2+</sup>. Os íons Mn<sup>2+</sup> livres são, provavelmente, complexados com a α<sub>2</sub>-macroglobulina e transportados para o fígado [51,52]. Os agentes de contraste Gd(BOPTA) [27,53] e Gd(EOB-DTPA) [54,55], embora possuam um fragmento lipofílico, são solúveis em água. O fragmento lipofílico contribui para a captação hepatocelular através da proteína transportadora de aniões [56,57] e para a associação não covalente com Albumina Sérica [58].

### 1.3 Referências

- [1] Bloch, F.; Hansen, W.W.; Packard, M.E.; *Phys Rev*, **1946**, 69, 127
- [2] Bloembergen, N.; Purcell, E.M.; Pound, R.V.; *Phys Rev*, **1948**, 73, 679–712
- [3] Geraldès, C. F. G. C.; Gil, V. M. S. *Ressonância Magnética Nuclear: Fundamentos, Métodos e Aplicações*, **1987**, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa
- [4] Lauterbur, P.C.; *Nature*, **1973**, 242, 190–191
- [5] Petersen, S.B.; Muller, R.N.; Rinck, P.A.; *An introduction to biomedical nuclear magnetic resonance*. **1985**, Thieme, Stuttgart New York
- [6] Hugi, A.D.; Helm, L.; Merbach, A.E.; *Helv. Chim. Acta*, **1985**, 68, 508-521
- [7] Koenig, S.H.; Brown III, R.D.; *Prog. Nucl. Magn Reson. Spectrosc.* **1991**, 22, 487-567
- [8] Freed, J.H.; *J. Chem. Phys.* **1978**, 68, 4034-4037.
- [9] Vander Elst, L.; Raynal, I.; Port, M.; Tisnés, P.; Muller, R.N.; *Eur J Inorg Chem*, **2005**, 1142–1148
- [10] Muller, R.N.; Raduchel, B.; Laurent, S.; Platzek, J.; Piérart, C.; Mareski, P.; Vander Elst, L.; *Eur J Inorg Chem*, **1999**, 1949–1955
- [11] Laurent, S.; Elst, L. V.; Muller, R. N. *Contrast Med Mol Imaging*, **2006**, 1, 128-137.
- [12] Micskei, K.; Helm, L.; Brucher, E.; Merbach, A.E.; *Inorg Chem*, **1993**, 32, 3844–3850
- [13] Micskei, K.; Powell, D.H.; Helm, L.; Brücher, E.; Merbach, A.E.; *Magn Reson Chem*, **1993**, 31, 1011–1020
- [14] Shukla, R.; Zhang, X.; Tweedle, M.; *Inverst Radiol*, **1991**, 26, S224–S225
- [15] Helms, M.K.; Petersen, C.E.; Bhagavan, N.V.; Jameson, D.M.; *Time-resolved fluorescence studies on site-directed mutants of human serum albumin FEBS Letters*, **1997**, 408, 67–70
- [16] Vander Elst, L.; Maton, F.; Laurent, S.; Seghi, F.; Chapelle, F.; Muller, R.N.; *Magn Reson Med*, **1997**, 38, 604–614
- [17] Aime, S.; Botta, M.; Fasano, M.; Terreno, E.; *Acc Chem Res*, **1999**, 32, 941–949
- [18] Lauterbur, P.C.; Mendonça-Dias, M.H.; Rudin, A.M.; Dutton PO, Leigh J, Scarpa A (eds) *Frontiers of Biological Energetics*. Academic Press, New York, **1978**, pp 752–759
- [19] Caravan, P.; Ellison, J. J.; McMurry, T. J.; Lauffer, R. B. *Chemical Review*, **1999**, 99, 2293.
- [20] Tóth, É.; Helm, L.; Merbach, A. E. *Top. Current Chem.* **2002**, 221, 61.

- [21] Magerstadt, M.; Gansow, O.A.; Brechbiel, M.W.; Colcher, D.; Balzer, L.; Knop, R.H.; Girton, M.E.; Naegele, M.; *Magn Reson Med*, **1986**, 3, 808–812
- [22] Bousquet, J.C.; Saini, S.; Stark, D.D.; Hahn, P.F.; Nigam, M.; Wittenberg, J.; Ferrucci, J.T.; *Radiology*, **1988**, 166, 693–698
- [23] Cacheris, W.P.; Quay, S.C.; Rocklage, S.M.; *Magn Reson Imaging*, **1990**, 8, 467–481
- [24] Vogler, H.; Platzek, J.; Schuhmann-Giampieri, G.; Frenzel, T.; Weimann, H.J.; Radüchel, B.; Press, W.R.; *Eur J Radiol*, **1995**, 21, 1-10
- [25] Platzek, J.; Blaszkiewicz, P.; Gries, H.; Luger, P.; Mishi, G.; Muller-Fahrnow, A.; Raduchel, B.; Sulzle, D.; *Inorg Chem*, **1997**, 36, 6086–6093
- [26] Tombach, B.; Heindel, W.; *Eur Radiol*, **2002**, 12, 1550–1556
- [27] Uggeri, F.; Aime, S.; Anelli, P.L.; Botta, M.; Brocchetta, M.; de Haen, C.; Ermondi, G.; Grandi, G.; Paoli, P.; *Inorg Chem*, **1995**, 34, 633–642
- [28] Weinmann, H.J.; schulmann-Giampiepi, G.; Scmitt-willich, H.; Vogler, H.; Frenzei, G.H; *Mag. Resom. Med.*, **1991**, 22, 233-237
- [29] Lauffer, R.; *Chem Rev*, **1988**, 187, 901–927
- [30] Harpur, E.S.; Worah, D.; Hals, P.A.; Holtz, E.; Furuham, K., Nomura, H.; *Invest Radiol*, **1993**, 28, S28–S432
- [31] Caravan, P.; Ellison, J.J.; McMurry, T.J.; Lauffer, R.; 1999, *Chem Rev*, 99, 2293–2352
- [32] Tweedle, M.F.; Hagan, J.J.; Kumar, K.; Mantha, S.; Chang, C.A.; *Magn Reson Imaging*, **1991**, 9, 409–415
- [33] Wedeking, P.; Kumar, K.; Tweedle, M.F.; *Magn Reson Imaging*, **1992**, 10, 641–648
- [34] Laurent, S.; Vander Elst, L.; Copoix, F.; Muller, R.N.; *Invest Radiol*, **2001**, 36, 115–122
- [35] Idée, J.M.; Port, M.; Raynal, I.; Schaefer, M.; Le Greneur, S.; Corot, C.; *Fundam Clin Pharmacol*, **2006**, 20, 563–576
- [36] Thomsen, H.S.; *Eur Radiol*, **2006**, 16, 619–2621
- [37] Den Boer, J.A.; Hoogeveen, R.; *Medica Mundi*, **2001**, 45, 10–22
- [38] Bogdanov, A.A.Jr; Lewin, M.; Weissleder, R.; *Adv Drug Delivery Rev*, **1999**, 37, 279–293

- [39] Torres, S.; Prata, M.I.M.; Santos, A.C.; André, J.P.; Martins, J.A.; Helm, L.; Tóth, É.; García-Martín, M.L.; Rodrigues, T.B.; López-Larrubia, P.; Cerdán, S.; Geraldès, C.F.G.C.; *NMR Biomed.*, **2008**, 21, 322
- [40] Parac-Vogt, T.N.; Kimpe, K.; Laurent, S.; Piérart, C.; Vander Elst, L.; Muller, R.N.; Binnemans, K.; 2006, *Eur Biophys J*, 35, 136–144
- [41] Corot, C.; Schaefer, M.; Beauté, S.; Bourrinet, P.; Zehaf, S.; *Acta Radiol*, **1997**, 38, 91–99
- [42] Kobayashi, H.; Kawamoto, S.; Saga, T.; Sato, N.; Hiraga, A.; Ishimori, T.; Konishi, J.; Togashi, K.; Brechbiel, M.W.; *Magn Reson Med*, **2001**, 46, 781–788
- [43] Parmelee, D.J.; Walovitch, R.C.; Ouellet, H.S.; Lauffer, R.B.; *Invest Radiol*, **1997**, 32, 741–747
- [44] Bremerich, J.; Colet, J.M.; Giovenzana, G.B.; Aime, S.; Scheffler, K.; Laurent, S.; Bongartz, G.; Muller, R.N.; *J Magn Reson Imaging*, **2001**, 13, 588–593
- [45] Aime, S.; Botta, M.; Fasano, M.; Terreno, E.; *Chem Soc Rev*, **1998**, 27, 19–29
- [46] Kroft, L.J.M.; de Roos, A.; *J Magn Reson Imaging*, **1999**, 10, 395–403
- [47] Turetschek, K.; Floyd, E.; Shames, D.M.; Roberts, T.P.L.; Preda, A.; Novikov, V.; Corot, C.; Carter, W.O.; Brasch, R.C.; *Magn Reson Med*, **2001**, 45, 880–886
- [48] Gaillard, S.; Kubiak, C.; Stolz, C.; Bonnemain, B.; Chassard, D.; *Invest Radiol*, **2002**, 37, 161–166
- [49] Rofsky, N.M.; Weinreb, J.C.; Bernardino, M.E.; Young, S.W.; Lee, J.K.; Noz, M.E.; *Radiology*, **1993**, 188, 53–59
- [50] Marchal, G.; Zhang, X.; Ni, Y.; Van Hecke, P.; Yu, J.; Baert, A.L.; *Magn Reson Imaging*, **1993**, 11, 665–674
- [51] Elizondo, G.; Fnetz, C.J.; Stank, D.D.; Scott, M.; Rocklage, S.M.; Quay, S.C.; Wonah, D.; Tsang, Y.M.; Chen, M.C-M.; Ferrucci, J.T.; *Radiology*, **1991**, 178, 73–78
- [52] Toft, K.G.; Hustvedt, S.O.; Grant, D.; Friisk, G.A.; Skotland, T.; *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, **1997**, 22, 65–72
- [53] Morisetti, A.; Bussi, S.; Tirone, P.; de Häen, C.; *J Comput Assist Tomogr*, **1999**, 23, S207–S217
- [54] Weinmann, H.J.; Schuhmann-Giampiepi, G.; Schmitt-Willich, H.; Vogler, H.; Frenzei; Gries, H.; *Magn Reson Med*, **1991**, 22, 233–237

- [55] Schuhmann-Giampieri, G.; Schmitt-Willich, H., Press, W.R.; Negishi, C., Weinmann, H.J.; Speck, U.; *Radiology*, **1992**, 183, 59–64
- [56] Reimer, P.; Schneider, G.; Schima, W.; *Eur Radiol*, **2004**, 14, 559–578
- [57] van Montfoort, J.E.; Stieger, B., Meijer, D.K.F.; Weinmann, H.J.; Meier, P.J.; Fattering, K.E.; *J Pharmacol Exp Ther*, **1999**, 290, 153–157
- [58] Silvério, S.; Torres, S.; Martins, J.A.; André, J.P.; Helm, L.; Martins, A.F.; Prata, M.I.M.; Santos, A.C.; Geraldes, C. F.G.C.; *Dalton Transactions*, **2009**, 24, 4656-4670

# 2

**Gd(DO<sub>3</sub>A-*N*- $\alpha$ -aminopropionato): um novo *shintão* para síntese de agentes de contraste endereçados de alta relaxividade para IRM**

## 2.1 Resumo

A síntese de agentes quelantes do tipo poli(azacarboxilatos) funcionalizados com grupos pendentes para conjugação a fragmentos orgânicos ou (bio)moléculas para uso em imagiologia médica e para aplicações terapêuticas, suscita um grande interesse na comunidade científica.

O ligando DO<sub>3</sub>A-*N*- $\alpha$ -aminopropionato, sintetizado no decorrer deste trabalho, representa um novo *shintão* para a síntese de Agentes de Contraste endereçados de alta relaxividade para Imagem por Ressonância Magnética (IRM). O comportamento relaxométrico do complexo Gd(DO<sub>3</sub>A-*N*- $\alpha$ -aminopropionato) foi estudado por RMN de <sup>17</sup>O e DRMN de <sup>1</sup>H, tendo-se obtido a partir da análise simultânea destes dados, os parâmetros mais importantes que determinam a relaxividade. O complexo [Gd(DO<sub>3</sub>A-*N*- $\alpha$ -aminopropionato)(H<sub>2</sub>O)] apresenta uma molécula de água na esfera interna de coordenação, tal como os complexos análogos [Gd(DOTA)(H<sub>2</sub>O)]<sup>-</sup> e [Gd(DO<sub>3</sub>A-*N*-Prop)(H<sub>2</sub>O)]<sup>-</sup>. O complexo Gd(DO<sub>3</sub>A-*N*- $\alpha$ -aminopropionato) apresenta uma velocidade de troca de água ( $k_{ex}$ ) aproximadamente uma ordem de grandeza superior à apresentada pelo complexo Gd(DOTA) e da mesma ordem de grandeza que o análogo Gd(DO<sub>3</sub>A-*N*-Prop). A estabilidade cinética do complexo Gd(DO<sub>3</sub>A-*N*- $\alpha$ -aminopropionato) foi avaliada através de estudos de transmetalção, tendo-se concluído que o complexo é inerte a pH 7,0 e estável numa gama larga de valores de pH (2,0 – 10,0).

Este novo sistema (ligando/complexo) reúne todas as características: estabilidade cinética, possibilidade de conjugação e velocidade de troca acelerada, para a preparação de Agentes de Contraste endereçados de alta relaxividade para IRM.



## 2.2 Introdução

Em IRM detecta-se a intensidade do sinal de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) dos prótons da água. A observação do sinal é facilitada pela grande abundância natural do nuclídeo  $^1\text{H}$ , aliada ao facto de 70% do corpo humano ser constituído por água. A intensidade do sinal de RMN varia consoante as áreas do corpo, com constituições diferentes, permitindo diferenciar tecidos normais de tecidos tumorais. No entanto, a imagem obtida por IRM pode não ser suficientemente esclarecedora, recorrendo-se então ao uso de complexos metálicos de iões paramagnéticos, para melhorar a qualidade da imagem - Agentes de Contraste. O uso de metalofármacos paramagnéticos para aumentar o contraste em IRM é, em parte, responsável pelo lugar proeminente que esta modalidade de imagem médica ocupa na prática clínica [1]. Actualmente, aproximadamente 30% dos exames de imagiologia por ressonância magnética (IRM) incluem o uso de agentes de contraste. À medida que novos agentes de contraste vão surgindo esta percentagem tende a aumentar. Os complexos de  $\text{Gd}^{3+}$  são os agentes de contraste mais importantes para IRM devido ao seu elevado paramagnetismo ( $4f^7$ ) e aos tempos longos de relaxação de spin electrónico do centro metálico [2,3].

A eficácia de um agente de contraste é medida pela sua capacidade para diminuir selectivamente os tempos de relaxação das moléculas de água na sua vizinhança. Este fenómeno é expresso em termos de relaxividade ( $r_i$ ,  $i=1,2$ ), a qual mede a diminuição dos tempos de relaxação dos prótons das moléculas de água numa solução contendo 1 mM do agente paramagnético [4].

O maior desafio no desenho de novos Agentes de Contraste consiste na associação de uma elevada relaxividade a uma elevada bioespecificidade, o que permitiria reduzir a dose requerida para obter um contraste efectivo. De acordo com a teoria de Solomon-Bloembergen-Morgan, um tempo de correlação rotacional ( $\tau_r$ ) longo, uma velocidade de troca de água ( $k_{ex}$ ) óptima, entre a primeira esfera de coordenação e as águas do meio exterior, e um tempo óptimo de relaxação de spin electrónico ( $T_{ei}$ ,  $i=1,2$ ) vão contribuir para a obtenção de um sistema de relaxividade elevada [4].

O tempo de correlação rotacional é parâmetro mais fácil de otimizar por desenho de ligandos [5]. A ligação covalente de quelatos de Gd<sup>3+</sup> a macro(bio)moléculas (polímeros lineares, carboidratos, proteínas e dendrímeros) com rotação lenta em solução permite aumentar o tempo de correlação rotacional dos quelatos [6]. A auto-associação de complexos monoméricos em estruturas supramoleculares (micelas, lipossomas, bicamadas, etc.) ou a sua associação não covalente com proteínas (principalmente Albumina Sérica) permite também aumentar  $\tau_r$  [7]. No entanto, na maioria dos casos o aumento de relaxividade conseguido por otimização de  $\tau_r$  fica aquém do previsto pela teoria devido à flexibilidade das estruturas formadas [7].

A conjugação de agentes quelantes, usualmente do tipo poli(aminocarboxilatos), baseados no esqueleto dos ligandos DTPA e DOTA, a moléculas orgânicas é geralmente feita através de ligações amida, por uma questão de conveniência sintética, há uma variedade de métodos sintéticos para a formação de ligações amida e devido à robustez (*in vitro* e *in vivo*) da ligação amida [8]. A conjugação através de um dos braços acetato requer a diferenciação de um dos átomos de azoto do esqueleto do *ciclono*, através de alquilação sequencial com agentes alquilantes do tipo bromoacetato com grupos protectores ortogonais. A substituição de um grupo carboxilato, bom grupo coordenante, por um grupo amida, menos eficiente, tem várias consequências. Por um lado, a substituição reduz tanto a estabilidade termodinâmica [9] como a estabilidade cinética do complexo, comprometendo as suas potenciais aplicações *in vivo*. Por outro lado, a redução da carga global do complexo reduz a velocidade de troca ( $k_{ex}$ ) da molécula de água na primeira esfera de coordenação, limitando potencialmente a relaxividade que poderia ser atingida por complexos com  $\tau_r$  otimizado [7]. A solução para este problema consiste na introdução de grupos funcionais pendentes, para conjugação a biomoléculas, nas pontes etilenodiamina do esqueleto dos ligandos DTPA e DOTA, ou nos braços acetato. Vários exemplos desta estratégia foram descritos na literatura [10,11]. Alguns agentes quelantes, com grupos funcionais pendentes reactivos, prontos para conjugação fácil a (bio)moléculas podem mesmo ser adquiridos comercialmente [12].

Quelatos com carga global negativa e com compressão estérica em torno do local de ligação da água, apresentam, em geral, uma velocidade de troca ( $k_{ex}$ ) elevada. O aumento de compressão estérica pode ser conseguido, por desenho de ligandos, através da substituição de uma ponte etilénica no esqueleto dos ligandos DOTA e DTPA, por uma ponte propilénica [4]. A substituição de um braço acetato por um braço propionato nos ligandos DOTA e DTPA também aumenta a velocidade de troca, ainda que o efeito seja menos acentuado [13].

Neste trabalho descrevemos a via sintética para a preparação de um novo agente quelante, DO<sub>3</sub>A-*N*- $\alpha$ -aminopropionato, e a caracterização relaxométrica do respectivo complexo de Gd<sup>3+</sup>.

## 2.3 Resultados e discussão

### 2.3.1 Design e síntese do agente quelante DO<sub>3</sub>A-*N*- $\alpha$ -aminopropionato

Um agente quelante ideal para o desenvolvimento de agentes de contraste de alta relaxividade para IRM deveria preencher os seguintes requisitos: 1. pertencer à classe de agentes quelantes macrocíclicos, do tipo DOTA, para garantir uma elevada estabilidade cinética e termodinâmica dos respectivos complexos de Gd<sup>3+</sup> - condição essencial para aplicações seguras *in vivo*; 2. ter grupos funcionais pendentes para conjugação fácil a (bio)moléculas para endereçamento para receptores celulares e/ou otimização de  $\tau_r$ ; 3. apresentar uma velocidade de troca elevada, que não limite a relaxividade potencialmente atingível com complexos com  $\tau_r$  otimizado.

A consideração destes aspectos levou-nos a pensar que o agente quelante **13** (Figura 2.1) poderia reunir todas as propriedades desejadas:

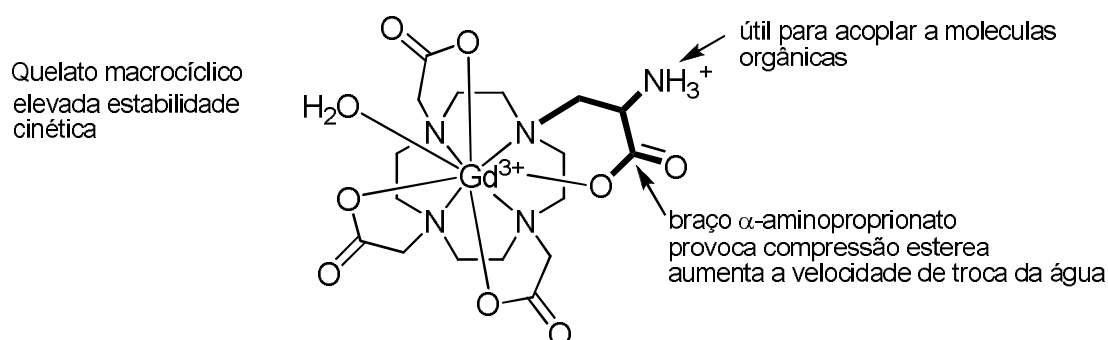
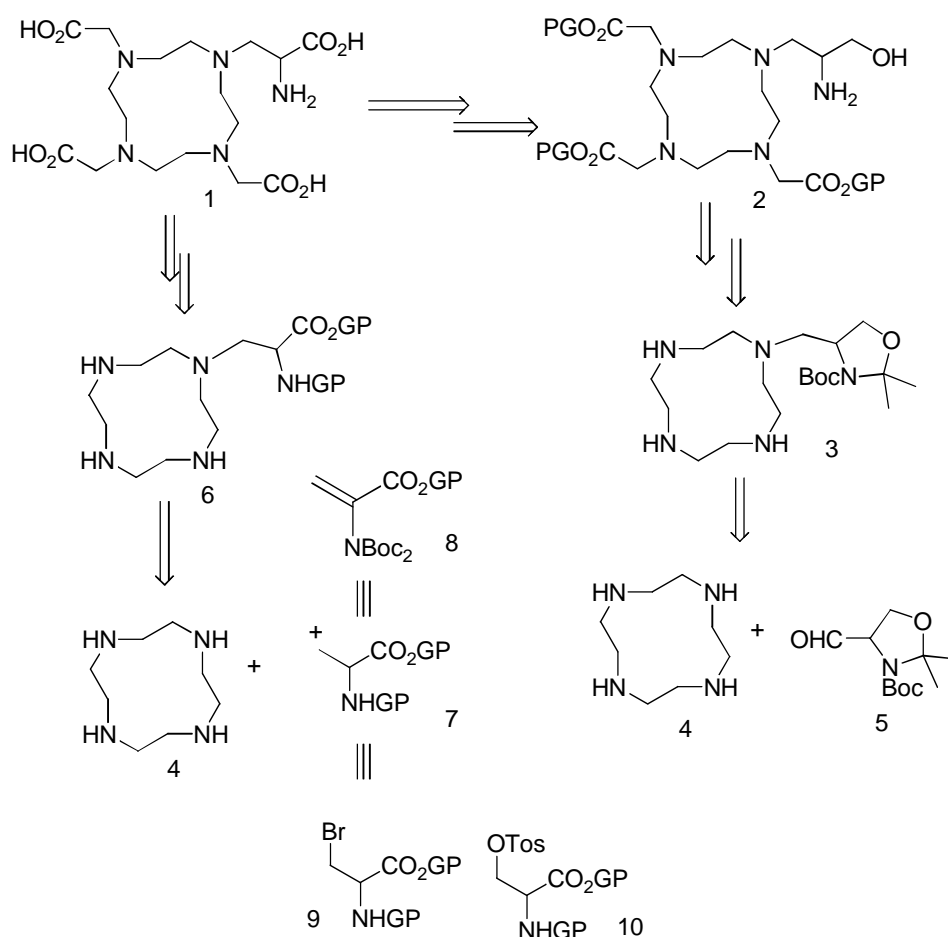


Figura 2.1– Estrutura do complexo [Gd(DO<sub>3</sub>A-*N*- $\alpha$ -aminopropionato)(H<sub>2</sub>O)] (**13**)

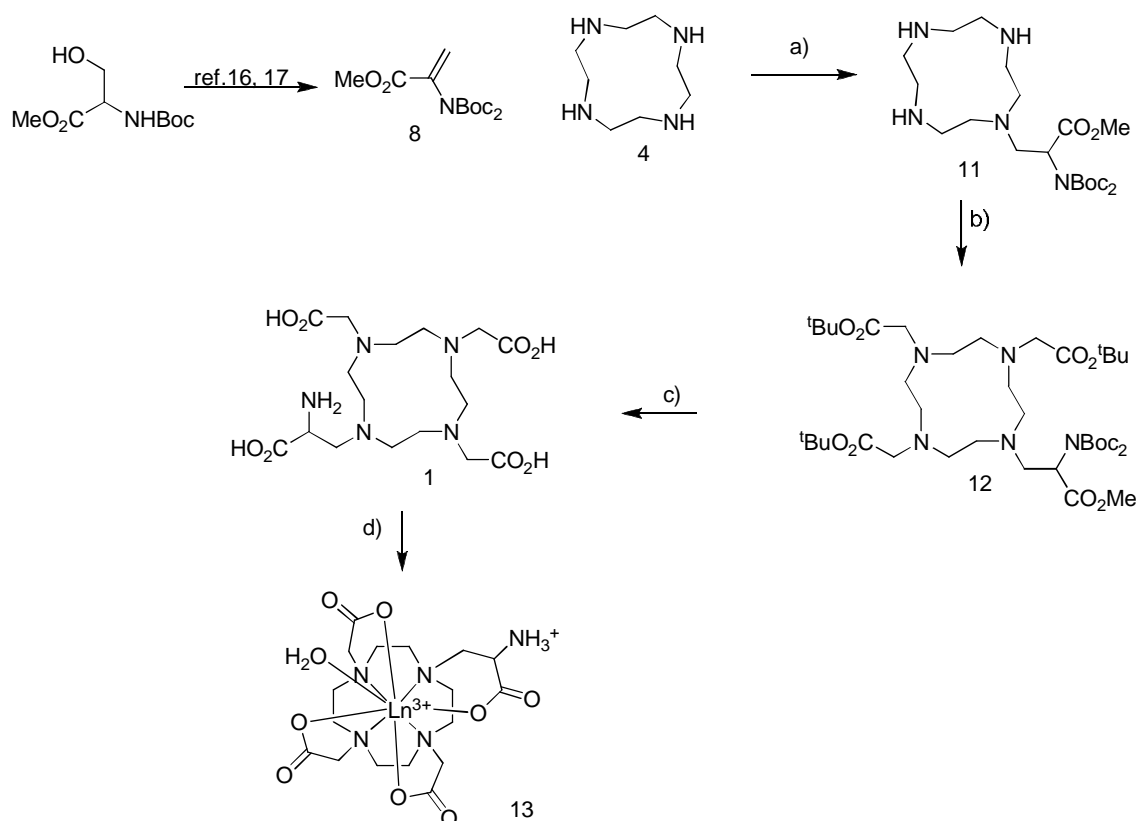
Sendo um agente quelante macrocíclicos, baseado no esqueleto DOTA é previsível que os respectivos complexos de Gd<sup>3+</sup> apresentem uma alta estabilidade cinética e termodinâmica, suficiente para aplicações *in vivo*. A substituição de um braço acetato por um braço propionato é previsível que gere compressão estérea à volta do local de coordenação da água e leve a uma velocidade de troca acelerada. O grupo amina pendente no braço propionato poderia ser usado para conjugação com (bio)moléculas. A análise retrossintética deste agente quelante levou-nos a considerar várias vias sintéticas possíveis (Esquema 2.1).

Esquema 2.1– Análise retrossintética para a síntese do ligando DO<sub>3</sub>A-*N*- $\alpha$ -aminopropionato

A introdução do braço  $\alpha$ -aminopropionato no ciclono é a etapa crucial desta síntese. A análise retrossintética sugere um *sintão electrofílico* baseado num derivado do aminoácido de serina (Esquema 2.1).

A experiência do nosso grupo com o aldeído de Garner (5), sugere que o braço  $\alpha$ -aminopropionato poderia ser introduzido por aminação reductiva do aldeído de Garner com *ciclono* [14].

No entanto, no decurso deste estudo, encontramos várias referências bibliográficas relatando a síntese e o uso do reagente *N*-Boc<sub>2</sub>- $\Delta$ -AlaOMe (8) (esquema 2.1) em reacções de adição de Michael a aminas, em condições suaves e com altos rendimentos [15,16]. O reagente *N*-Boc<sub>2</sub>- $\Delta$ -AlaOMe pode ser preparado num passo por desidratação de *N*-Boc-metilserina, sendo estável à temperatura ambiente por períodos prolongados. Decidimos, pois enveredar por esta via de síntese (Esquema 2.2).



Esquema 2.2– Esquema sintético para a preparação do ligando DO<sub>3</sub>A-*N*- $\alpha$ -aminopropionato e dos respectivos complexos de íons lantanídeo(III) (Ln= La, Eu, Sm, Gd). a) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/MeCN b) *tert*-butilbromoacetato, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/MeCN c) i) HCl/EtOH, ii) Dowex 1x2-100 OH<sup>-</sup> d) LnCl<sub>3</sub>. xH<sub>2</sub>O

A adição de Michael de *N*-Boc<sub>2</sub>- $\Delta$ -AlaOMe (**8**) (1,0 equivalentes) ao *ciclono* foi realizada usando *ciclono* em excesso (1,5 equivalentes), na presença de um excesso de base, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, em acetonitrilo. O uso de *ciclono* em excesso tem como objectivo maximizar o rendimento em produto mono-alquilado (**11**). É, no entanto, possível verificar por TLC a presença de pequenas quantidades compostos *bis*- e *tris*-alquilados. A purificação do produto mono-alquilado, da mistura contendo os produtos bis-alquilado e *tris*-alquilados e o excesso de *ciclono*, foi realizada por cromatografia flash. A adição de Michael do reagente *N*-Boc<sub>2</sub>- $\Delta$ -AlaOMe ao *ciclono* gera, como esperado, um composto racémico. Esta é, provavelmente, a principal desvantagem deste método em comparação com outros métodos (possíveis) baseados em reacções de alquilação (do tipo S<sub>N</sub>2) com derivados electrofílicos preparados a partir de *L* ou *D* serina (Esquema 2.1). Nas condições usadas para a segunda alquilação, 3,3 equivalentes de

reagente alquilante e 4,5 equivalentes de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> em acetonitrilo, a análise da mistura reaccional *crude* por RMN de <sup>1</sup>H, revela o aparecimento de quantidades variáveis (10-30% mol), dependendo das condições reacionais, de *N*-Boc<sub>2</sub>- $\Delta$ -AlaOMe, originado provavelmente por retroadição de Michael. Purificação por cromatografia flash permite obter o produto alquilado (**12**) puro, livre de contaminação com *ciclono* *tris*-alquilado e *tetra*-alquilado. A desprotecção dos grupos protectores *tert*-Butilooxicarbonilo (*Boc*) e dos grupos éster *tert*-butilo no composto **12**, foi efectuada com HCl-EtOH (3 M), seguido de hidrólise do grupo éster metílico com resina de troca iónica Dowex 1X2 OH<sup>-</sup> e eluição com HCl (solução aquosa, 0.1 M). O tratamento do composto **12** com HCl, gera um composto, na forma hidrocloreto, protegido no braço aminopropionato. O tratamento do hidrocloreto com a resina na forma OH<sup>-</sup> leva à ligação do composto, completamente desprotegido, à resina. Lavagem da resina com água permite remover impurezas catiónicas e impurezas sem carga. A eluição da coluna com HCl permite recuperar o composto (**1**) com um grau de pureza analítica com um rendimento global de 36%. A retroadição de Michael durante a segunda reacção de alquilação pode complicar a purificação do produto final, caso o composto completamente alquilado (**12**) não seja obtido puro nesta etapa. É pois necessário otimizar a segunda reacção de alquilação; testar outros solventes (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), bases diferentes (por exemplo Diisopropietilamina (DIPEA), trietilamina (TEA) e diferentes razões molares dos reagentes. Uma vez que a retroadição de Michael é catalisada por base, a ordem de desprotecção do composto completamente alquilado (**12**) não pode ser invertida.

### 2.3.2 Estudos da dinâmica em solução dos complexos de Ln(DO<sub>3</sub>A-*N*- $\alpha$ -aminopropionato) (Ln(III)= La, Sm, Eu) por RMN de <sup>1</sup>H.

Os Estudos da dinâmica em solução dos complexos de iões Ln<sup>3+</sup>, Ln(DO<sub>3</sub>A-*N*- $\alpha$ -aminopropionato), e a caracterização fiso-química do complexo Gd(DO<sub>3</sub>A-*N*- $\alpha$ -aminopropionato), (estudos de estabilidade em função do pH e transmetalacção), foram realizadas sob orientação do Professor Carlos Geraldês do Departamento de Bioquímica da Universidade de Coimbra e contaram com a participação do estudante

de Doutoramento André Martins do Departamento de Bioquímica da Universidade de Coimbra.

A síntese dos complexos foi efectuada por adição de 1,1 equivalentes de uma solução do metal  $\text{LnCl}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$  ao ligando a pH~5,5. Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos complexos diamagnéticos ( $\text{Ln} = \text{La}$ ) e paramagnéticos ( $\text{Ln} = \text{Sm}, \text{Eu}$ ) foram obtidos em  $\text{D}_2\text{O}$  a 25 °C. No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do complexo de  $\text{Eu}^{3+}$  e de  $\text{Sm}^{3+}$  é possível identificar vinte e cinco picos principais, indicando que o complexo apresenta uma conformação do tipo C1. A presença de quatro picos a desvios químicos altos (42,1, 32,0, 27,6 e 27,6 ppm) revelam que o complexo de  $\text{Eu}^{3+}$  apresenta maioritariamente uma geometria quadrada antiprismática (square antiprismatic (SA or M)), existindo vestígios da geometria quadrada antiprismática distorcida (twisted square antiprismatic (TSA or m)) (Figura 2.2).



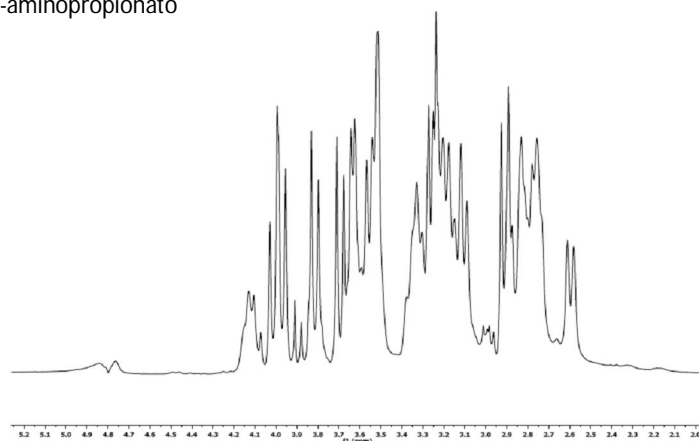
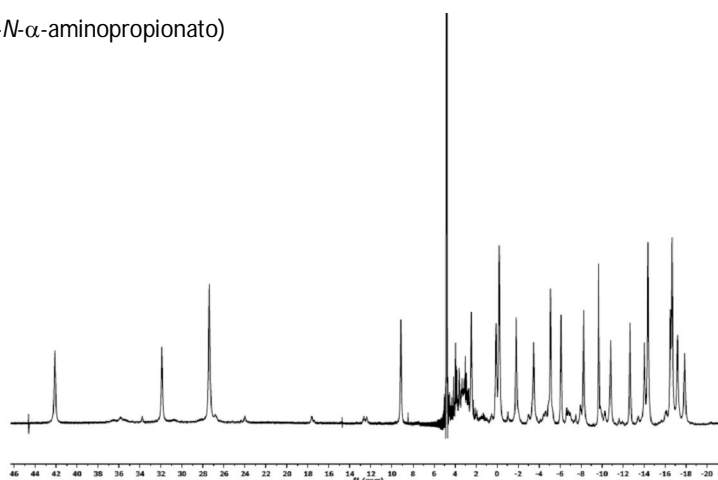
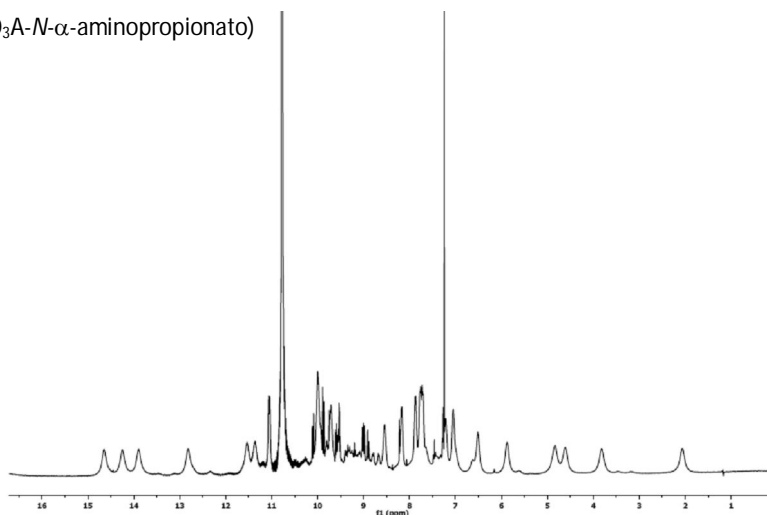
a) 500 MHz DO<sub>3</sub>A-*N*- $\alpha$ -aminopropionatob) 600 MHz Eu(DO<sub>3</sub>A-*N*- $\alpha$ -aminopropionato)c) 600 MHz Sm(DO<sub>3</sub>A-*N*- $\alpha$ -aminopropionato)

Figura 2.2– Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  a 600 MHz em D<sub>2</sub>O (20 mM, pH 7,0, 298 K) de: a) ligando DO<sub>3</sub>A-*N*- $\alpha$ -aminopropionato; b) complexo Eu(DO<sub>3</sub>A-*N*- $\alpha$ -aminopropionato) e c) complexo Sm(DO<sub>3</sub>A-*N*- $\alpha$ -aminopropionato)

É também possível afirmar através da análise do comportamento dos espectros do complexo de Eu<sup>3+</sup> em função do pH (Figura 2.3), que a pH 7,0 o complexo de Eu<sup>3+</sup> tem carga global neutra, uma vez que o grupo amina está protonado a este valor de

pH. O alargamento dos sinais no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do complexo de  $\text{Eu}^{3+}$  ao passar de pH 8,0 para 9,0, resulta provavelmente da desprotonação do grupo amina, sugerindo que o  $pK_a$  do grupo amina se encontra nesta região.

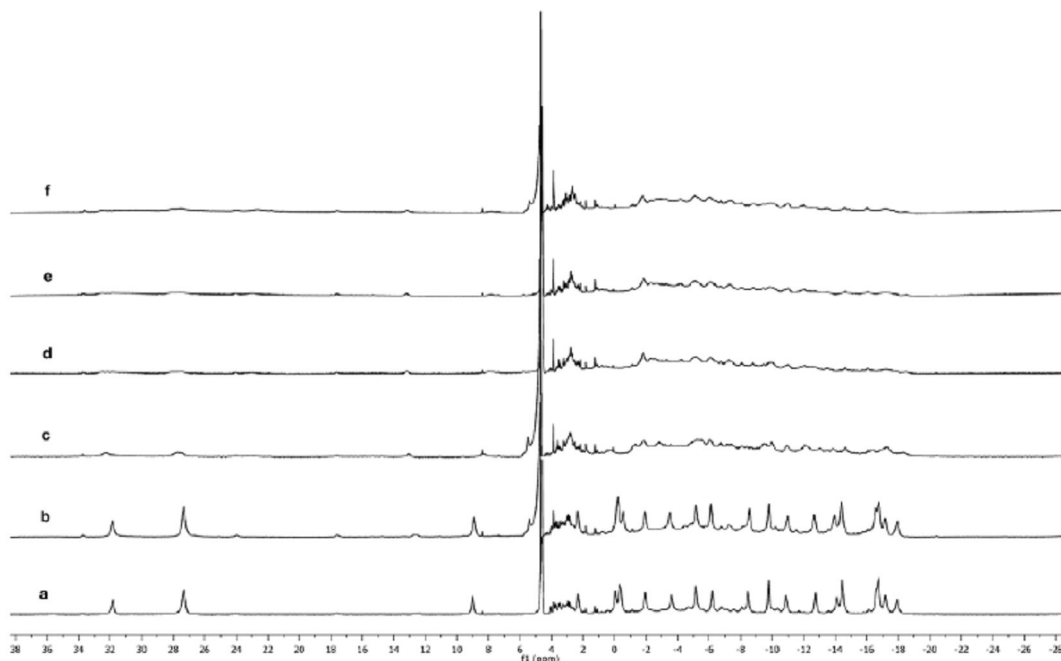


Figura 2.3– Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  a 600 MHz em  $\text{D}_2\text{O}$  (20 mM, 298 K) do complexo  $\text{Eu}(\text{DO}_3\text{A}-N-\alpha\text{-aminopropionato})$  a diferentes valores de pH: entre a- pH 7,0 e f- pH 12,0, respectivamente.

Dos estudos de relaxividade protónica do complexo  $\text{Gd}(\text{DO}_3\text{A}-N-\alpha\text{-aminopropionato})$  em função do pH podemos concluir que o complexo é muito estável em água numa faixa alargada de valores de pH (2,0-10,0) (Figura 2.4). Esta informação é relevante no contexto da condição Fibrose Sistémica Nefrogénica (NSF), recentemente reportada, associada com o uso repetido de agentes de contraste baseados em complexos de  $\text{Gd}^{3+}$  com ligandos de cadeia aberta do tipo DTPA-bisamida [17]. Esta condição resulta da desmetalção de complexos de baixa estabilidade cinética e termodinâmica a pH baixo durante o processo de filtração glomerular [17].

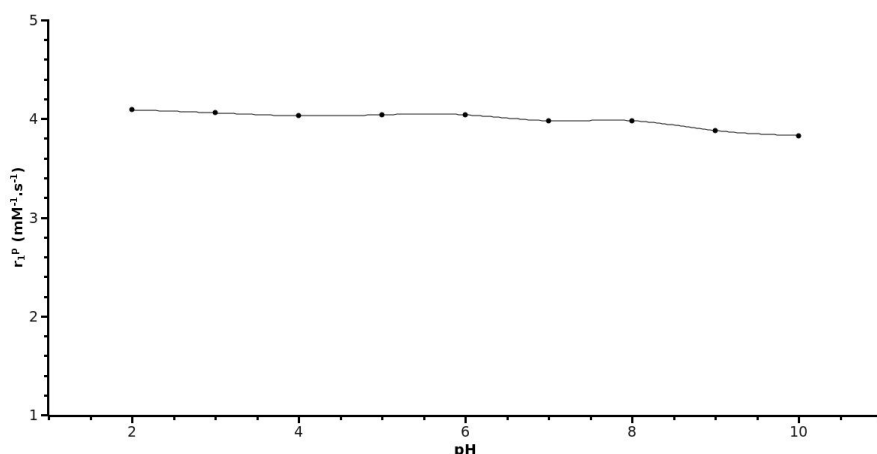


Figura 2.4– Representação gráfica da velocidade de relaxação paramagnética longitudinal ( $R_1^p$ ) em função do pH para uma solução do complexo Gd(DO<sub>3</sub>A-*N*- $\alpha$ -aminopropionato) (1 mM) a 20 MHz, 310 K.

### 2.3.3 Estudos de transmetalção com Zn<sup>2+</sup>.

A estabilidade cinética do complexo Gd(DO<sub>3</sub>A-*N*- $\alpha$ -aminopropionato) em solução foi avaliada através de experiências de transmetalção em solução de tampão fosfato (PBS, 10 mM, pH 7,1) contendo uma quantidade equimolar de Zn<sup>2+</sup>. A precipitação de GdPO<sub>4</sub>, por substituição do íon Gd<sup>3+</sup> no complexo por íon Zn<sup>2+</sup>, leva a uma diminuição, dependente do tempo, da velocidade de relaxação paramagnética longitudinal dos prótons da água ( $R_1^p$ ). Na Figura 2.5 representa-se graficamente, a evolução com o tempo, da razão  $R_1^p(t)/R_1^p(0)$ .  $R_1^p(t)$  representa a velocidade de relaxação ao tempo  $t$  e  $R_1^p(0)$  representa a velocidade de relaxação ao tempo zero, para uma solução 0,75 mM do complexo Gd(DO<sub>3</sub>A-*N*- $\alpha$ -aminopropionato) em tampão PBS e em tampão PBS contendo íon Zn<sup>2+</sup>.

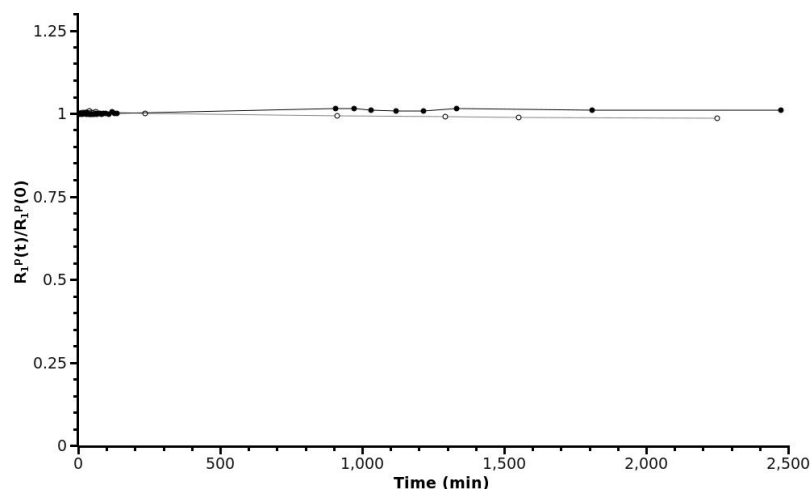


Figura 2.5- Evolução da velocidade relativa de relaxação paramagnética dos prótons da água  $R_1^{\rho}(t)/R_1^{\rho}(0)$  (20 MHz, pH 7,1, 310 K) em função do tempo para uma solução de complexo Gd(DO<sub>3</sub>A-*N*- $\alpha$ -aminopropionato) (0,75 mM) numa solução 10 mM de tampão PBS (círculos cheios) e numa solução 10 mM de tampão PBS contendo um equivalente de íão Zn<sup>2+</sup> (círculos vazios).

A partir do gráfico é possível verificar que praticamente não ocorre substituição de Gd<sup>3+</sup> por Zn<sup>2+</sup>. Este resultado leva-nos a pensar que o complexo quando administrado *in vivo* não vai sofrer transmetalção.

Por outro lado, a estabilidade do complexo a pH ácido (Figura 2.4) reduz a probabilidade de desmetalção durante o processo de excreção renal [17].

### 2.3.4 RMN de <sup>17</sup>O e experiências de DRMN de <sup>1</sup>H.

As experiências de RMN de <sup>17</sup>O e de DRMN de <sup>1</sup>H, foram realizadas pelo Estudante de Doutoramento André Martins, no Centre de Biophysique Moleculaire em Orleans, França, sob orientação do Professor Carlos Geraldês do Departamento de Bioquímica da Universidade de Coimbra e da Professora Éva Tóth do Centre de Biophysique Moleculaire. A velocidade de troca de água para o complexo Gd(DO<sub>3</sub>A-*N*- $\alpha$ -aminopropionato) foi determinada através de estudos de RMN de <sup>17</sup>O. Com o objectivo de determinar os parâmetros que descrevem a troca de água, rotação, relaxação electrónica e relaxividade protónica, foi medida a dependência da relaxividade longitudinal ( $r_1$ ) dos prótons da água do campo magnético através da técnica de Dispersão das Relaxação Magnética Nuclear (DRMN) de <sup>1</sup>H para o complexo Gd(DO<sub>3</sub>A-*N*- $\alpha$ -aminopropionato) a 298 e 310 K (Figura 2.6)).

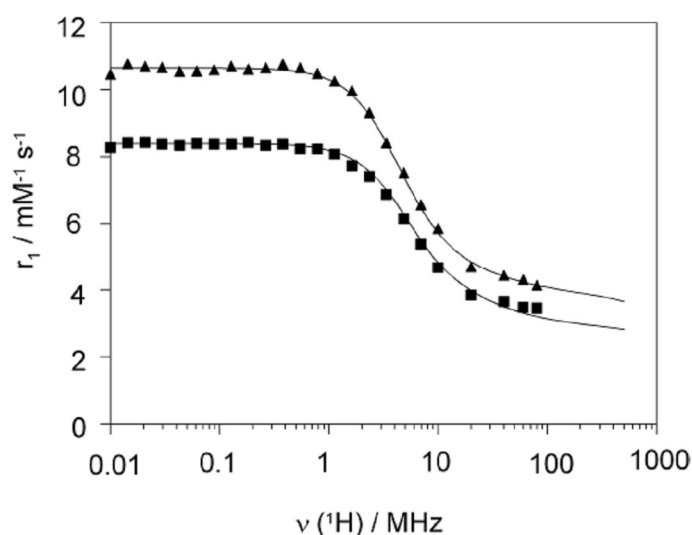


Figura 2.6- Perfis de DRMN de  $^1\text{H}$  a 25 °C (triângulos) e 37 °C (quadrados) para o complexo  $\text{Gd}(\text{DO}_3\text{A-}N\text{-}\alpha\text{-aminopropionato})$ . As linhas representam o ajuste simultâneo dos dados de RMN de  $^{17}\text{O}$  e DRMN de  $^1\text{H}$ .

A dependência da velocidade de relaxação transversal ( $1/T_{2r}$ ) e dos desvios químicos ( $\Delta\omega_r$ ) de RMN de  $^{17}\text{O}$  da temperatura (Figura 2.7 a e b)), foram analisados simultaneamente usando as equações de Solomon-Bloembergen-Morgan.

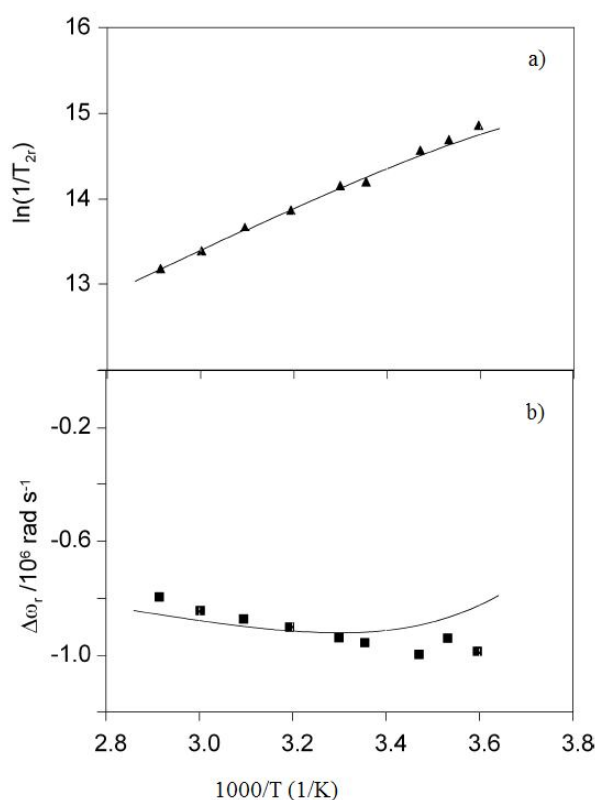


Figura 2.7- Dependência da velocidade de relaxação transversal reduzida de  $^{17}\text{O}$  a) e dos desvios químicos reduzidos de  $^{17}\text{O}$  b) da temperatura a  $B= 11,7 \text{ T}$ .

Na tabela 2.1 são apresentados os parâmetros mais relevantes obtidos para o complexo Gd(DO<sub>3</sub>A-*N*- $\alpha$ -aminopropionato), assim como os parâmetros reportados para os complexos análogos Gd(DO<sub>3</sub>A-*N*-Prop) e Gd(DOTA).

Tabela 2.1- Parâmetros obtidos para o complexo Gd(DO<sub>3</sub>A-*N*- $\alpha$ -aminopropionato) a partir do ajuste dos dados RMN de <sup>17</sup>O e DRMN de <sup>1</sup>H. Indicam-se também, para comparação, os valores reportados na literatura, para os mesmos parâmetros, para os complexos Gd(DO<sub>3</sub>A-*N*-Prop) e para o complexo Gd(DOTA).

Ligando	DO <sub>3</sub> A- <i>N</i> - $\alpha$ -aminopropionato	DO <sub>3</sub> A- <i>N</i> -Prop <sup>a</sup>	DOTA <sup>b</sup>
$q(\text{H}_2\text{O})$	1	1	1
$\Delta H^\ddagger$ [J/K/mol]	19,1 $\pm$ 1,6	30,2 $\pm$ 3,4	49,8 $\pm$ 1,5
$\Delta S^\ddagger$ [kJ/mol]	-35 $\pm$ 6	+35,6 $\pm$ 5,7	+48,5 $\pm$ 4,9
$k_{\text{ex}}^{298}$ [10 <sup>7</sup> s <sup>-1</sup> ]	4 $\pm$ 0,4	6,1 $\pm$ 1,9	0,41 $\pm$ 0,02
$ER$ [kJ/mol]	17 $\pm$ 1	22,4 $\pm$ 6,1	16,1 $\pm$ 7,4
$\tau_{\text{RH}}^{298}$ [ps]	71 $\pm$ 6	153 $\pm$ 12	77 $\pm$ 4 <sup>c</sup>
$EV$ [kJ/mol]	1	1,0	1,0
$\tau_V^{298}$ [ps]	11 $\pm$ 1	7,0	11 $\pm$ 1
$\Delta^2$ [10 <sup>20</sup> s <sup>-2</sup> ]	0,25 $\pm$ 0,02	0,97 $\pm$ 0,8	0,16 $\pm$ 0,01
$A/\hbar$ [10 <sup>6</sup> rad/s]	-3,6 $\pm$ 0,3	-3,3 $\pm$ 0,5	-3,7 $\pm$ 0,2
$D_{\text{GdH}}^{298}$ [10 <sup>-10</sup> m <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> ]	26	----	22 $\pm$ 1
$E_{\text{DGdH}}^{298}$ [kJ/mol]	20	----	20,1 $\pm$ 1,1

<sup>a</sup> Ref. 11; <sup>b</sup> Ref. 17; <sup>c</sup>  $\tau_{\text{RO}}^{298}$  valores de T<sub>1</sub> obtidos por <sup>17</sup>O

Através da análise dos dados podemos verificar que a velocidade de troca de água no complexo Gd(DO<sub>3</sub>A-*N*- $\alpha$ -aminopropionato) ( $k_{\text{ex}} = 4 \pm 0,4 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$ ) é da mesma ordem de grandeza que a apresentada pelo complexo análogo Gd(DO<sub>3</sub>A-*N*-Prop) ( $k_{\text{ex}} = 6,1 \pm 1,9 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$ ) e aproximadamente uma ordem de grandeza mais alta que a apresentada pelo complexo Gd(DOTA) ( $k_{\text{ex}} = 0,46 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$ ). A velocidade de troca  $k_{\text{ex}}$  obtida para o complexo em estudo, cai dentro do intervalo estreito de valores de  $k_{\text{ex}}$  (2,5 – 5,0  $\times 10^7 \text{ s}^{-1}$ ) considerados óptimos para atingir altas relaxividades a campos intermédios [11].

O valor obtido para a entropia de activação para a troca de água no complexo Gd(DO<sub>3</sub>A-*N*- $\alpha$ -aminopropionato) ( $\Delta S^\ddagger = -35 \pm 6 \text{ JK}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ) sugere que o processo de troca ocorre através de um mecanismo associativo. Para os complexos Gd(DO<sub>3</sub>A-*N*-Prop) e Gd(DOTA) os valores da entropia de activação para o processo de troca de

água, ( $\Delta S^\ddagger = +35,6 \pm 5,7 \text{ JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$ ) e ( $\Delta S^\ddagger = +65 \text{ JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$ ) respectivamente, indicam que a troca de água nestes complexos ocorre através de um processo dissociativo. O aumento da velocidade de troca por substituição de uma ponte etilénica, por uma ponte propilénica, ou por substituição de um braço acetato, por um braço propionato, nos ligandos DOTA e DTPA, tem sido racionalizada pelo fenómeno de compressão estérea à volta do local de ligação da água na primeira esfera de coordenação [11]. No mecanismo dissociativo o abandono da molécula de água é a etapa determinante da velocidade do processo de troca de água. De acordo com este modelo, a compressão estérea deveria aumentar a velocidade de troca para processos que ocorrem por um mecanismo dissociativo [6]. Por outro lado, para processos associativos, como é o caso do complexo em estudo, a compressão estérea não explica o aumento da velocidade de troca. A modificação da estrutura do ligando é provável que leve a uma alteração do poliedro de coordenação, favorecendo um mecanismo associativo, com menor energia de activação para os parâmetros de troca de água [18]. A carga positiva no grupo amina também é provável que facilite a troca de água no mecanismo associativo.

## 2.4 Conclusão

Realizamos com sucesso o design, síntese e caracterização de um novo ligando DO<sub>3</sub>A-*N*- $\alpha$ -aminopropionato. Para a síntese deste ligando foi concebida uma nova via sintética expedita, usando pela primeira vez a adição de Michael da desidroalanina *N*-Boc<sub>2</sub>- $\Delta$ -AlaOMe para instalar o braço  $\alpha$ -aminopropionato no esqueleto do *ciclono*.

O complexo Gd(DO<sub>3</sub>A-*N*- $\alpha$ -aminopropionato) foi estudado por uma variedade de técnicas visando a sua caracterização como um novo Agente de Contraste para IRM: estabilidade em função do pH e estudos de transmetalção; e caracterização relaxométrica por DRMN de <sup>1</sup>H e estudos de RMN de <sup>17</sup>O.

Os resultados deste estudo levam-nos a afirmar que o complexo Gd(DO<sub>3</sub>A-*N*- $\alpha$ -aminopropionato) e o ligando DO<sub>3</sub>A-*N*- $\alpha$ -aminopropionato constituem novos *sintões* para a síntese de agentes quelantes endereçados de alta relaxividade para IRM: i) o complexo Gd(DO<sub>3</sub>A-*N*- $\alpha$ -aminopropionato) apresenta uma velocidade de troca acelerada, dentro do intervalo estreito óptimo para atingir altas relaxividades a campos intermédios; ii) o grupo amina pendente no complexo Gd(DO<sub>3</sub>A-*N*- $\alpha$ -aminopropionato) pode ser usado para conjugação com (bio)moléculas, com o objectivo de endereçamento ou optimização de  $\tau_R$ ; iii) o complexo Gd(DO<sub>3</sub>A-*N*- $\alpha$ -aminopropionato) é estável no intervalo de pH 2,0-10,0 e é inerte em relação a transmetalção com ião Zn<sup>2+</sup>.

A via sintética desenvolvida é versátil: modificação do esquema de grupos protectores poderá permitir a obtenção de compostos com protecção ortogonal para desprotecção selectiva do grupo amina e conjugação com (bio)moléculas usando condições de acoplamento standard.



## 2.5 Secção experimental

### 2.5.1 Materiais e equipamentos

Os reagentes usados foram adquiridos à Sigma-Aldrich e utilizados sem qualquer purificação adicional. Foram usados solventes do maior grau de pureza disponível (p.a.), os quais foram purificados, quando especificado, pelos métodos usuais. O *cicleno* foi fornecido pela empresa Chematech. As reacções foram seguidas por TLC Kieselgel 60 F254 (Merck) em suporte de alumínio. Os processos de revelação utilizados foram a observação sob luz UV (254 nm), a adsorção de vapor de iodo e por imersão em solução de ninidrina (~1%) seguida de aquecimento. A cromatografia de flash foi feita em Kieselgel 60 (Merck, 230-400). A cromatografia de troca iónica foi efectuada em resina Dowex 1X2-OH<sup>-</sup>, adquirida à Sigma-Aldrich. A resina foi adquirida na forma Cl<sup>-</sup> e convertida para a forma OH<sup>-</sup> por passagem com solução aquosa de hidróxido de sódio 1 M. As fracções relevantes das cromatografias foram reunidas e concentradas a pressão reduzida, T < 40 °C. Os espectros de RMN de <sup>1</sup>H (1D e 2D) e de <sup>13</sup>C foram obtidos num espectómetro Varian Unity Plus 300 RMN, operando a 299,938 MHz e 75,428 MHz para <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C respectivamente. Os desvios químicos ( $\delta$ ) são dados em ppm relativamente ao solvente CDCl<sub>3</sub> (<sup>1</sup>H,  $\delta$  7,27; <sup>13</sup>C  $\delta$  77,36) como referência interna. Para espectros de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C em D<sub>2</sub>O os desvios químicos ( $\delta$ ) são dados em ppm, em relação a TSP como referência interna (1H,  $\delta$  0,0) e *tert*-butanol como referência externa (<sup>13</sup>C,  $\delta$  30,29). A espectroscopia de massa foi efectuada no CACTI-Vigo, Espanha.

### 2.5.2 Procedimentos experimentais

**Síntese de metil 2-(bis(tert-butoxicarbonil)amino)-3-(1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1-il)propanoato (11):** Adicionou-se K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1,46 g, 10,6 mmol) a uma solução de 1,4,7,10-tetraazacyclododecane (**4**) (0,920 g, 5,34 mmol) em MeCN (40 cm<sup>3</sup>). A esta solução foi adicionado Boc<sub>2</sub>- $\Delta$ -Ala-OMe (1,065 g, 3,53 mmol). A solução permaneceu sob agitação à temperatura ambiente durante 2 horas e 30 minutos. O sólido foi removido por filtração e a solução concentrada a pressão reduzida. A purificação por cromatografia de flash (100% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> --> CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH/NH<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O

(50:50:1:1)) forneceu o composto pretendido **11** (1,287 g, 77,0%). RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ =1,47 (s, 18H, Boc<sub>2</sub>), 2,50-2,80 (m, 16H, CH<sub>2</sub>), 3,78 (dd, J= 5,4 Hz, 1H, ABX), 3,49 (dd, J=14,4 e 5,4 Hz, 1 H, ABX), 3,69 (s, 3H, OMe), 5,00 (t, J= 5,4Hz, 1H, ABX). RMN de <sup>13</sup>C (75,4 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 27,92 (6C, CCH<sub>3</sub>), 44,74 (2C, CH<sub>2</sub>), 45,89 (2C, CH<sub>2</sub>), 46,72 (2C, CH<sub>2</sub>), 50,76 (2C, CH<sub>2</sub>), 52,20 (1C, OCH<sub>3</sub>), 55,52 (1C, CH<sub>2</sub>CH), 56,08 (1C, CH), 83,29 (2C, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 151,87 (2C, C(O)), 170,80 (1C, C(O)OCH<sub>3</sub>). HRMS (ESI): m/z: cacd para C<sub>22</sub>H<sub>44</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>: 474,3292, obtido: 474,3286.

**Síntese de trietil 2,2',2''-(10-(2-(bis(tert-butoxicarbonil)amino)-3-metoxi-3-oxopropil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triil)triacetato (12):** Adicionou-se K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1,53 g, 11,07 mmol) a uma solução de metil 2-(bis(tert-butoxicarbonil)amino)-3-(1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1-il)propanoato (**11**) (0,87 g, 1,84 mmol), em MeCN (40 cm<sup>3</sup>). A esta suspensão adicionou-se uma solução de *tert*-butilbromoacetato (1,10 cm<sup>3</sup>, 7,35 mmol). A suspensão foi agitada à temperatura ambiente durante 3 horas. O sólido foi removido por filtração e a solução foi concentrada a pressão reduzida. Purificação por cromatografia flash (100% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> --> CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH (1:1)) forneceu o composto pretendido (**12**) (0,852 g, 57%). RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ = 1,47 (s, 45H, Boc), 2,00-3,80 (observamos um conjunto de sinais largos que integram para 20 H, N(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N e NCHaHbCH), 3,53-3,61 (m, 2 H, ABX), 3,79 (s, 3H, OMe), 4,85 (bb, 1H, ABX). RMN de <sup>13</sup>C (75,4 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 27,93 (15C, CCH<sub>3</sub>), 52,66 (1C, CHCH<sub>2</sub>), 51,640 (4C, CH<sub>2</sub>), 51,89 (1C, CH<sub>2</sub>), 52,14 (3C, OCH<sub>3</sub>), 52,60 (1C, CH<sub>2</sub>), 56,25 (1C, CHCH<sub>2</sub>), 56,20 (1C, CH<sub>2</sub>), 56,46 (4C, CH<sub>2</sub>), 81,96 (2C, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 82,42 (1C, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 83,80 (2C, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 151,84 (2C, C(O)), 172,75 (3C, C(O)), 173,65 (1C, C(O)). HRMS (ESI): m/z: cacd para C<sub>40</sub>H<sub>74</sub>N<sub>5</sub>O<sub>12</sub>: 816,5334, obtido: 816,5328.

**Síntese do Ligando DO<sub>3</sub>A-*N*- $\alpha$ -amionopropionate (1):** o composto protegido (**12**) (0,822 g, 1,01 mmol) foi dissolvido numa mistura de etanol (10 cm<sup>3</sup>) / HCl (6 M, 10 cm<sup>3</sup>) e colocado sob agitação à temperatura ambiente durante 16 horas. O solvente foi evaporado sob pressão reduzida, o sólido foi redissolvido em H<sub>2</sub>O e evaporado novamente. Este processo foi repetido várias vezes. O óleo obtido foi redissolvido em H<sub>2</sub>O (30 cm<sup>3</sup>) e a solução foi ajustada a pH 10 - 11 através da adição de porções de resina Dowex-1X2-100 OH<sup>-</sup> (40 cm<sup>3</sup>). A suspensão foi mantida sob agitação à

temperatura ambiente durante 4 horas. A resina foi transferida para uma coluna, lavada com H<sub>2</sub>O e eluída com HCl 0.1 M. As frações identificadas por TLC (revelação com iodo) foram reunidas e evaporadas a pressão reduzida tendo-se obtido o composto pretendido como um sólido branco (**1**) (0,380 g, 61 %). RMN de <sup>1</sup>H (600 MHz, D<sub>2</sub>O): braços acetato CH<sub>2</sub> (sistemas AB): 3,98 (d), 3,78 (d); 3,92 (d), 3,68 (d); 3,22 (d), 2,90 (d); braço aminopropionato CH<sub>2</sub> (sistema ABX): 3,61 (dd), 3,25 (m), 2,80 (m); anel macrocíclico CH<sub>2</sub>: 4,10 (m), 4,06 (d), 3,85 (m), 3,56 (m), 3,53 (m), 3,50 (m), 3,33 (m), 3,30 (m), 3,18 (m), 3,15 (m), 3,10 (m), 2,97 (m), 2,87 (m), 2,75 (m), 2,70 (m), 2,60 (m). RMN de <sup>13</sup>C (75,4 MHz, D<sub>2</sub>O): 46,57 (CH<sub>2</sub>), 48,08 (CH<sub>2</sub>), 49,16 (CH<sub>2</sub>), 49,68 (CH<sub>2</sub>), 50,20 (CH<sub>2</sub>), 51,19 (CH<sub>2</sub>), 5,92 (CH<sub>2</sub>), 52,51 (CH), 53,32 (CH<sub>2</sub>), 54,26 (CH<sub>2</sub>), 55,36 (CH<sub>2</sub>), 57,11 (CH<sub>2</sub>), 58,19 (CH<sub>2</sub>), 170,45 (C(O)), 170,79 (C(O)), 172,67 (C(O)), 178,36 (CHC(O)). HRMS (ESI): m/z: calcd para C<sub>17</sub>H<sub>32</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub>: 434,2251, obtido: 434,2245.

Os espectros de 1D e g-COSY 2D RMN de <sup>1</sup>H do ligando DO<sub>3</sub>A-*N*- $\alpha$ -aminopropionato e os espectros de 1D RMN de <sup>1</sup>H dos complexos de Eu<sup>3+</sup> e Sm<sup>3+</sup> foram obtidos a 600,14 MHz, num espectrómetro Varian VNMRS 600 RMN.

### 2.5.3 Estudos de RMN de <sup>17</sup>O e DRMN de <sup>1</sup>H

#### **Preparação do complexo Gd(DO<sub>3</sub>A-*N*- $\alpha$ -aminopropionato) para estudos de RMN de <sup>17</sup>O e DRMN de <sup>1</sup>H.**

O complexo Gd(DO<sub>3</sub>A-*N*- $\alpha$ -aminopropionato), usado para os estudos de RMN de <sup>17</sup>O e para DRMN de <sup>1</sup>H, foi preparado por mistura de quantidades equimolares de Gd<sup>3+</sup> (solução de GdCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O) e do ligando DO<sub>3</sub>A-*N*- $\alpha$ -aminopropionato. Usou-se um ligeiro excesso ~5% de ligando. A solução do ligando foi mantida a pH 5,5, por adição de hidróxido de sódio (0,1 M), durante a adição da solução de Gd<sup>3+</sup> à solução do ligando. A solução foi mantida sob agitação durante 24 horas a 50 °C. A ausência de metal livre foi confirmada pelo teste do alaranjado de xilenol [19]. À solução do complexo foi adicionada água enriquecida (<sup>17</sup>O: 11,4%), para melhorar a sensibilidade dos testes. O complexo final apresentava uma concentração de 30,01 mmol kg<sup>-1</sup> a pH 6,75. Para os estudos de DRMN usou-se uma solução 1,0 mM, pH= 7,1 do complexo Gd(DO<sub>3</sub>A-*N*- $\alpha$ -aminopropionato).

### **Preparação de complexos de íons Lantanídeo(III) Ln(DO<sub>3</sub>A-*N*- $\alpha$ -aminopropionato), (Ln = La, Sm, Eu).**

A uma solução aquosa do ligando DO<sub>3</sub>A-*N*- $\alpha$ -aminopropionato, foi adicionada uma solução aquosa contendo 1 equivalente do correspondente íon lantanídeo (LnCl<sub>3</sub>.xH<sub>2</sub>O, Ln= La, Eu, Sm). A solução foi mantida a pH ~ 5,7, durante a adição da solução do íon lantanídeo, à solução do ligando, pela da adição de hidróxido de sódio (0,1 M). A solução foi mantida sob agitação durante 24 horas a 50 °C. A ausência de metal livre foi confirmada pelo teste do alaranjado de xilenol [19]. A solução foi concentrada sob pressão reduzida. As soluções para RMN de <sup>1</sup>H foram preparadas por dissolução dos sólidos obtidos em D<sub>2</sub>O (V= 1 cm<sup>3</sup>) obtendo-se uma concentração final de 20 mM. Os espectros de próton 1D e 2D g-COSY das soluções dos complexos paramagnéticos e diamagnéticos foram obtidos num espectrómetro de RMN Varian VNMRS 600 (14,09 T, 600,14 MHz).

### **Medições de RMN de <sup>17</sup>O**

As experiências de RMN de <sup>17</sup>O foram realizadas pelo estudante de doutoramento André Martins no grupo da Prof. Éva Tóth, do Centre de Biophysique Moleculaire, em Orleans, num espectrómetro Bruker Avance-500 (11,7T) equipado com um controlador de temperatura BVT-3000. As amostras foram seladas em esferas de vidro as quais foram introduzidas em tubos de 10mm para RMN, para eliminar correcções de susceptibilidade magnética [20,21]. As relaxações longitudinais 1/T<sub>1</sub> foram obtidas pelo método de inversão recuperação, e as relaxações transversais 1/T<sub>2</sub> pelo método Carr-Purcell-Meiboom-Gill de spin-eco. Como referência externa, usou-se uma amostra de água acidificada a pH 3,4.

### **Medições de DRMN**

As medidas foram efectuadas pelo estudante de doutoramento André Martins no grupo da Prof. Éva Tóth, do Centre de Biophysique Moleculaire, em Orleans, usando um relaxómetro Stelar Spinmaster FFC NMR (0,01- 20 MHz) equipado com um controlador de temperatura VTC90. Para campos mais elevados as medidas de DRMN de <sup>1</sup>H foram feitas usando relaxómetros Bruker Electromagnet 30MHz, 40MHz, 60MHz

e a 80MHz. Em cada caso a temperatura foi medida por uma técnica de substituição. Foram efectuadas medidas a duas temperaturas 298K e 310K.

### **Estudos de transmetalção com Zn<sup>2+</sup>**

A reacção de transmetalção do complexo Gd(DO<sub>3</sub>A-*N*- $\alpha$ -aminopropionato) com Zn<sup>2+</sup>, foi estudada pela diminuição da velocidade de relaxação longitudinal dos prótons de água,  $R_1^p$ , numa solução tampão PBS (pH 7,1, 10 mM) contendo 0,75 mM do complexo Gd(DO<sub>3</sub>A-*N*- $\alpha$ -aminopropionato) e uma quantidade equimolar de ZnCl<sub>2</sub> [22]. A velocidade de relaxação longitudinal dos prótons de água foi também medida em função do tempo numa solução tampão PBS (pH 7,1, 10 mM) contendo 0,75 mM do complexo Gd(DO<sub>3</sub>A-*N*- $\alpha$ -aminopropionato) [23].

## 2.6 Referências

- [1] Geraldes, C.F.G.C.; Gil, V.M.S. (1987) Ressonância Magnética Nuclear: Fundamentos, Métodos e Aplicações, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa
- [2] Caravan, P.; Ellison, J. J.; McMurry, T. J.; Lauffer, R. B.; *Chemical Review*, **1999**, 99, 2293.
- [3] Tóth, É.; Helm, L.; Merbach, A. E. Top.; *Current Chem.*, **2002**, 221, 61
- [4] Laus, S.; Ruloff, R.; Tóth, E.; Merbach, A.E. *Chem Eur J.*, **2003**, 9, 3555-3566
- [5] Caravan, P.; Cloutier, N.J.; Greenfield, M.T.; McDermid, S.A.; Dunham, S.U.; Bulte, J.W.M.; Amedio Jr., J.C.; Looby, R.J.; Supkowski, R.M.; Horrocks Jr., W. De W.; McMurry, T.J.; *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 3152-3162.
- [6] Aime, S.; Cabella, C.; Colombatto, S.; Crich, S. G.; Gianolio, E.; Maggioni, F. *J. Magn. Res. Imag.*, **2002**, 16, 394
- [7] Accardo, A.; Tesauro, D.; Aloj, L.; Pedone, C.; Morelli, Morelli, G. *Coordination Chemistry Reviews*, **2009**, 2193-2213
- [8] Woods, M.; Kovacs, Z.; Sherry, A.D. *Journal of Supramolecular Chemistry*, **2002**, 2, 115.
- [9] PaulRoth, C.; Raymond, K.N. *Inorg Chem* **1995**, 34, 14081412.
- [10] Denat, F.; Guillard, R.; *Synlett*, **2000**, 5, 561-574
- [11] Jászberényi, Z.; Sour, A.; Toth, É.; Merbach, M. E. *Chem.Eur.J.*, **2003**, 9, 3555
- [12] Botteman, F.; Nicolle, G.M.; Vander Elst, L.; Laurent, S.; Merbach, A.E.; Muller, R.N. *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2002**, 2686-2693.
- [13] Balogh, E.; Tripier, R.; Fouskova, P.; Reviriego, F.; Handel, H.; Tóth, É.; *Dalton Trans.* **2007**, 3572.
- [14] Torres, S.; Martins, J.A.; André, J.P.; Pereira, G.A.; Kiraly, R.; Brücher, E.; Helm, L.; Tóth, E.; Geraldes, C.F.G.C. *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2007**, 5489-5499
- [15] Ferreira, P.M.T.; Maia, H.L.S.; Monteiro, L.S.; and Sacramento, J. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1999**, 3697
- [16] Ferreira, P.M.T.; Maia, H.L.S.; Monteiro, L.S.; and Sacramento, J. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **2001**, 3167
- [17] Powell, D.H.; Dhuhghaill, O.M.N.; Pubanz, D.; Helm, L.; Lebedev, Y. S.; Schlaepfer, W.; Merbach, A. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 9333-9346.

- [18] Silvério, S.; Torres, S.; Martins, J.A.; André, J.P.; Helm, L.; Martins, A.F.; Prata, M.I.M.; Santos, A.C.; Geraldés, C. F.G.C.; *Dalton Transactions*, **2009**, 24, 4656-4670
- [19] Prajsnar, D.; *Chem. Anal.*, **1963**, 8, 71–75
- [20] Hugli, A.D.; Helm, L.; Merbach, A.E. *Helvetica Chimica Acta* **1985**, 68, 508-521.
- [21] Solomon, I. *Phys. Rev.* **1955**, 99, 559.
- [22] Laurent, S.; Elst, L. V.; Copoix, F.; Muller, R. N. *Invest Radiol* **2001**, 36, 115-122.
- [23] Laurent, S.; Luce Vander Elst; Vroman, A.; Muller, R. *Helvetica Chimica Acta* **2007**, 90, 562-573.





# 3

**Nanopartículas de ouro funcionalizadas com  
agentes quelantes: síntese e caracterização.**

### 3.1 Resumo

O design e a síntese de agentes de diagnóstico que permitam caracterizar e medir *in vivo* alterações moleculares associadas com o início e progressão de estados patológicos representa um desafio actual. O agente de diagnóstico tem de ser endereçado para alvos específicos e ter uma grande sensibilidade de detecção. Para ultrapassar a baixa sensibilidade de detecção do IRM, inerente ao fenómeno de RMN, é necessário usar quelatos de  $Gd^{3+}$  com alta relaxividade e *concentrar* um número elevado de quelatos num volume pequeno. As nanopartículas de ouro permitem condensar num volume relativamente pequeno, à volta do núcleo nanocristalino, uma monocamada densa de ligandos orgânicos. Os tiois são os melhores ligandos para estabilizar nanopartículas de ouro, devido à estabilidade da ligação Au-S e à facilidade da síntese. Nanopartículas de ouro (mistas) funcionalizadas com agentes quelantes para  $Gd^{3+}$  e com ligandos específicos para receptores celulares, representam estruturas endereçadas com alta *densidade de relaxividade* com grande potencial para aplicações em IRM.

Com este objectivo, foram sintetizados dois novos agentes quelantes conjugados com ácido lipóico: DOTA-Lipoamida **14** e  $DO_3A$ -*N*- $\alpha$ -aminopropionato-Lipoamida **15**. Nanopartículas de ouro, funcionalizadas com os agentes quelantes DOTA-Lipoamida e  $DO_3A$ -*N*- $\alpha$ -aminopropionato-Lipoamida, foram preparadas e caracterizadas por UV-Vis, DLS e através de medições de potencial Zeta. A complexação (*carregamento*) das nanopartículas com iões Lantanídeo(III) foi também estudada neste trabalho. A funcionalização de nanopartículas de ouro pré-formadas com citrato com o complexo  $Gd(DOTA\text{-Lipoamida})$  foi estudada por relaxometria e por espectroscopia de UV-Vis.

Foram ainda realizados estudos de biodistribuição de nanopartículas funcionalizadas com o agente quelante  $DO_3A$ -*N*- $\alpha$ -aminopropionato-Lipoamida marcadas com o isótopo radioactivo  $^{153}Sm^{3+}$ .

### 3.2 Introdução

A técnica de Imagem por Ressonância Magnética (IRM) revolucionou a imagem de diagnóstico a partir da sua introdução na prática clínica e na investigação biomédica no início dos anos oitenta. Hoje, cerca de 40- 50% de todos os estudos de IRM têm como objectivo a optimização de agentes de contraste [1].

As nanopartículas funcionalizadas são actualmente objecto de estudo intensivo como ferramentas úteis para o diagnóstico molecular, terapia e biotecnologia [2]. Um tempo de meia-vida vascular superior ao apresentado pelos agentes moleculares, sugere um elevado potencial para aplicações como agentes de contraste para imagem médica. [3,4,5]

Em 1994 foi publicado o método de *Brust-Schiffrin* para a síntese de nanopartículas de ouro. O desenvolvimento de um método fácil de preparação de nanopartículas de ouro, termicamente estáveis, e a possibilidade de controlo do seu tamanho desencadeou um grande entusiasmo sobre a preparação e estudo de nanopartículas (Figura 3.1) [6].

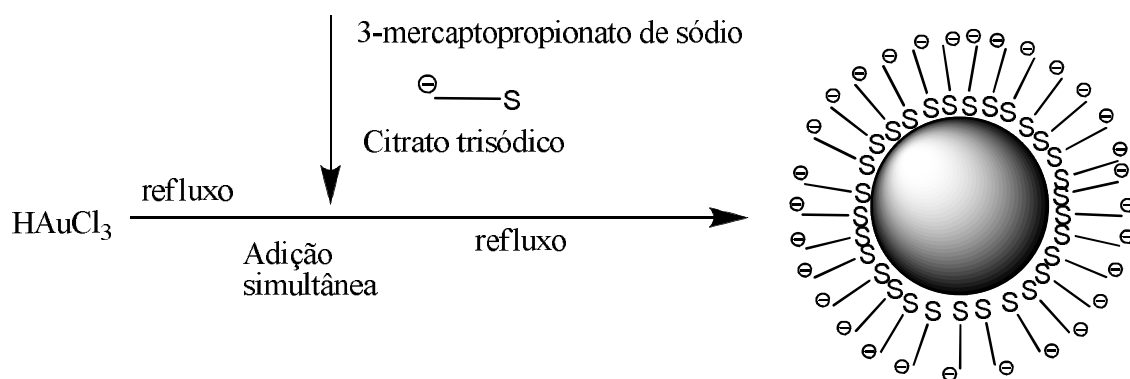


Figura 3.1- Procedimento para a preparação de nanopartículas de ouro estabilizadas em água com ligandos tiol [7].

As nanopartículas de ouro são facilmente estabilizadas e funcionalizadas por ligandos tiol. As nanopartículas de ouro apresentam uma cor vermelha característica, resultante da excitação da oscilação coerente dos electrões 6s da banda de condução do ouro por interacção com o campo electromagnético da luz incidente, *banda plasmónica* do ouro.

O  $\lambda_{\max}$  e a intensidade da *banda plasmónica* são influenciados pelo tamanho do núcleo metálico e pela espessura da monocamada orgânica e pela constante dieléctrica e temperatura do meio. Nanopartículas pequenas, com diâmetro inferior a 2 nm, não apresentam *banda plasmónica*. [7]

As nanopartículas de ouro são facilmente estabilizadas e funcionalizadas por ligandos tiol. As nanopartículas de ouro apresentam uma cor vermelha característica, resultante da excitação da oscilação coerente dos electrões  $6s$  da banda de condução do ouro por interacção com o campo electromagnético da luz incidente, *Banda Plasmónica* do ouro.

Para ultrapassar a baixa sensibilidade de detecção da IRM, inerente ao fenómeno de RMN, é necessário usar quelatos de  $Gd^{3+}$  com alta relaxividade e *concentrar* um número elevado de quelatos num volume pequeno. As nanopartículas de ouro permitem condensar num volume relativamente pequeno, à volta do núcleo nanocristalino, uma monocamada densa de ligandos orgânicos. A rigidez do núcleo metálico e o empacotamento denso da monocamada reduz a flexibilidade dos quelatos. Nanopartículas de ouro (mistas) funcionalizadas com agentes quelantes para  $Gd^{3+}$  e com ligandos específicos para receptores celulares, representam estruturas endereçadas com alta *densidade de relaxividade* com grande potencial para aplicações em IRM. A alta densidade de electrões das nanopartículas, permite também o seu uso como agentes de imagem bimodais para tomografia computadorizada de raio-X [8].

Foram publicados recentemente alguns estudos sobre a preparação e aplicação de nanopartículas de ouro funcionalizadas com quelatos de  $Gd^{3+}$  como agentes de contraste para IRM. Em 2006 *Debouttière* e colaboradores reportaram a preparação de nanopartículas de ouro funcionalizadas com o derivado DTDTPA do agente quelante DTPA (Figura 3.2). A redução de uma solução de ácido tetracloaúrico,  $HAuCl_4$ , por adição de uma solução de borohidreto de sódio, na presença do agente quelante  $\omega$ -tiol funcionalizado DTDTPA, produziu nanopartículas com tamanhos entre 2 e 2,5 nm. Foi calculado que cada nanopartícula estaria *decorada* com aproximadamente 150 moléculas de ligando, obtendo-se uma relação de 2 ligandos por cada átomo de ouro, resultante da polimerização do ligando ditiol [9].

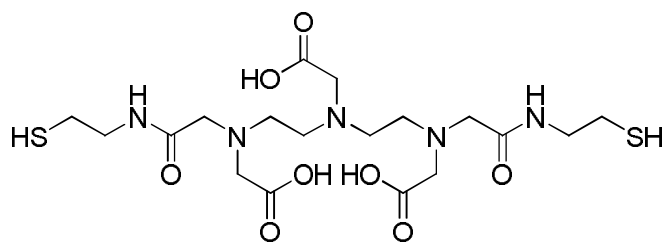


Figura 3.2- Estrutura do ligando  $\omega$ -tiol funcionalizado DTDTPA [9]

Os valores de relaxividade obtidos por *Debouttière* para as nanopartículas funcionalizadas com o complexo Gd(DTDTPA) e para o complexo Gd(DTDTPA) livre em solução são da mesma ordem de grandeza,  $r_1 = 3,9 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$  e  $3,0 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (25 °C, 300 MHz) respectivamente. A *concentração* de 150 quelatos à volta do núcleo de ouro, num volume pequeno, cria objectos com alta *densidade de relaxividade*,  $585 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , por nanopartícula.

Mais recentemente, em 2008 *Park* e colaboradores [10] reportaram a preparação de nanopartículas de ouro funcionalizadas com um conjugado do tipo DTPA-bisamida com *L*-glutathiona (Figura 3.3).

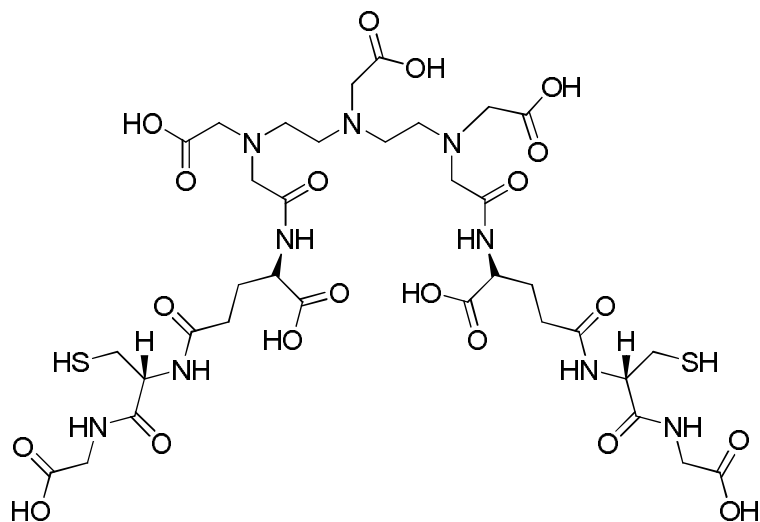


Figura 3.3- Estrutura do conjugado DTPA-bisamida-*L*-glutathiona usado por *Park* e colaboradores [10].

As nanopartículas apresentavam tamanhos, determinados por TEM e DLS, entre 5 e 7 nm, com aproximadamente  $1,36 \times 10^4$  ligandos por nanopartícula. A possibilidade de formação de dímeros e polímeros através da formação de ligações

dissulfeto entre os ligandos explica a excepcional densidade de quelatos na superfície das nanopartículas. O complexo Gd(DTPA-bisamida-L-glutaciona) apresenta um valor de  $r_1 = 10,5 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (25 °C, 60 MHz) em solução e um valor de  $r_1 = 13,4 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (25 °C, 60 MHz) quando ligado às nanopartículas. As nanopartículas funcionalizadas com o complexo Gd(DTPA-bisamida-L-glutaciona) apresentam relaxividade  $r_1 = 1,85 \times 10^5$  (25 °C, 60 MHz) por nanopartícula.

Mais recentemente, *Helm* e colaboradores [11] reportaram a síntese de nanopartículas de ouro funcionalizadas com um novo ligando, Dt, derivado do agente quelante DTTA (Figura 3.4). Neste estudo foram obtidas partículas com um tamanho médio de 4,8 nm, com uma distribuição de tamanhos entre 1 e 13 nm, e uma razão molar Au/Gd de 3,6.

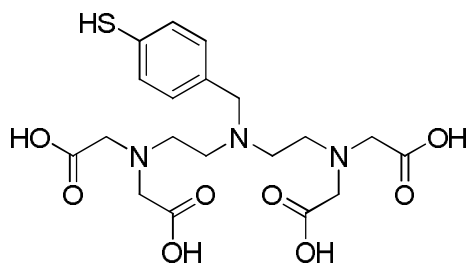


Figura 3. 4- Estrutura do agente quelante  $\omega$ -tiol funcionalizado Dt, derivado do DTPA [11].

Cada nanopartícula, composta por aproximadamente 201 átomos de ouro, está decorada com cerca de 56 quelatos e com 112 moléculas de água na primeira esfera de coordenação. Para as nanopartículas funcionalizadas com o complexo Gd(Dt) foi calculada uma relaxividade  $r_1 = 60 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (25 °C, 30 MHz) por quelato, em comparação com as relaxividades reportadas por Debouttière,  $r_1 = 3,9 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , e Park,  $r_1 = 13,6 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , respectivamente. A alta relaxividade obtida por *Helm* e colaboradores, resulta provavelmente da existência de 2 moléculas de água na primeira esfera de coordenação do complexo Gd(Dt) ( $q = 2$ ) e da rigidez do complexo na superfície das nanopartículas, devido ao *linker* curto, pouco flexível usado para ligação ao núcleo metálico.

Também em 2009 *Penadés* e colaboradores [12], reportou a síntese de gliconanopartículas funcionalizadas com um agente quelante  $\omega$ -tiol funcionalizado do tipo DO<sub>3</sub>A (Figura 3.5).

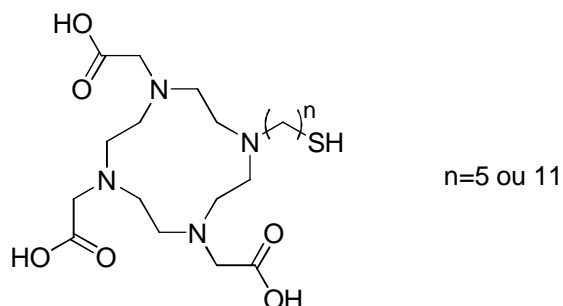


Figura 3.5- Estrutura do agente quelante DO<sub>3</sub>AC<sub>n</sub>SH usado por *Penadés et al.* [12].

As nanopartículas mistas (gliconanopartículas) apresentam um tamanho 2-3 nm. Os valores de relaxividade obtidos para as nanopartículas, por quelato de Gd<sup>3+</sup>  $r_1 = 1,4 - 25 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (37 °C, 60 MHz) dependem do tipo de açúcar e do comprimento de tiol usado para ancorar o quelato à superfície das nanopartículas. Grande parte das amostras apresentam valores de relaxividade da mesma ordem de grandeza do valor obtido para o quelato em solução  $r_1 = 4,8 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (37 °C, 20 MHz). No entanto existem algumas amostra possuem valores superiores em uma ordem de grandeza ao obtido para o quelato em solução.

### 3.3 Resultados e discussão

Todos os sistemas descritos atrás sofrem de algum tipo de limitação relativamente à sua aplicação como Agentes de Contraste de alta relaxividade *in vivo*. As nanopartículas descritas por *Debouttière e Park* usam agentes quelantes do tipo DTPA-bisamida, com presumivelmente baixa estabilidade cinética e termodinâmica dos respectivos complexos de  $Gd^{3+}$ , comprometendo a sua potencial aplicação *in vivo*. Por outro lado, as relaxividades obtidas para as nanopartículas funcionalizadas com quelatos de  $Gd^{3+}$  são semelhantes às medidas para os quelatos em solução, reflectindo provavelmente, a flexibilidade do ligando e o efeito limitante da baixa velocidade de troca de água,  $k_{ex}$ , de complexos do tipo DTPA-bisamida na relaxividade. Ainda que sofrendo das mesmas limitações, baixa relaxividade, as nanopartículas descritas por *Penadés et al.* representam um avanço, combinando à volta do mesmo núcleo metálico elementos de *endereçoamento* e *repórteres* para IRM. As nanopartículas descritas por *Helm* apresentam alta relaxividade, devido à rigidez do complexo e às duas moléculas de água na primeira de esfera de coordenação dos quelatos. A relaxividade pode, no entanto, estar a ser limitada pela velocidade de troca de água,  $k_{ex}$ , sub-optima de complexos do tipo DTTA [13]. Por outro lado, está amplamente documentado que complexos de  $Gd^{3+}$  com ligandos do tipo DTTA não têm estabilidade cinética e termodinâmica suficiente para aplicações *in vivo*.

Neste capítulo vão ser apresentados e discutidos, os resultados obtidos na síntese e caracterização de nanopartículas de ouro funcionalizadas com agentes os agentes quelantes DOTA-Lipoamida e  $DO_3A$ -*N*- $\alpha$ -aminopropionato-Lipoamida (Figura 3.6)



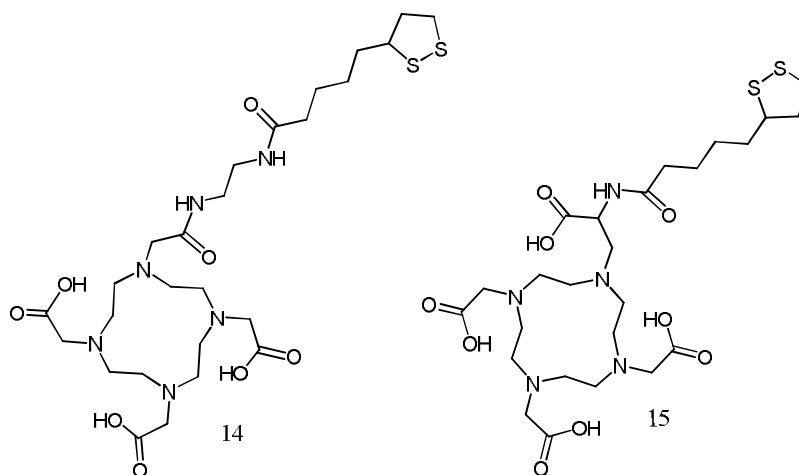
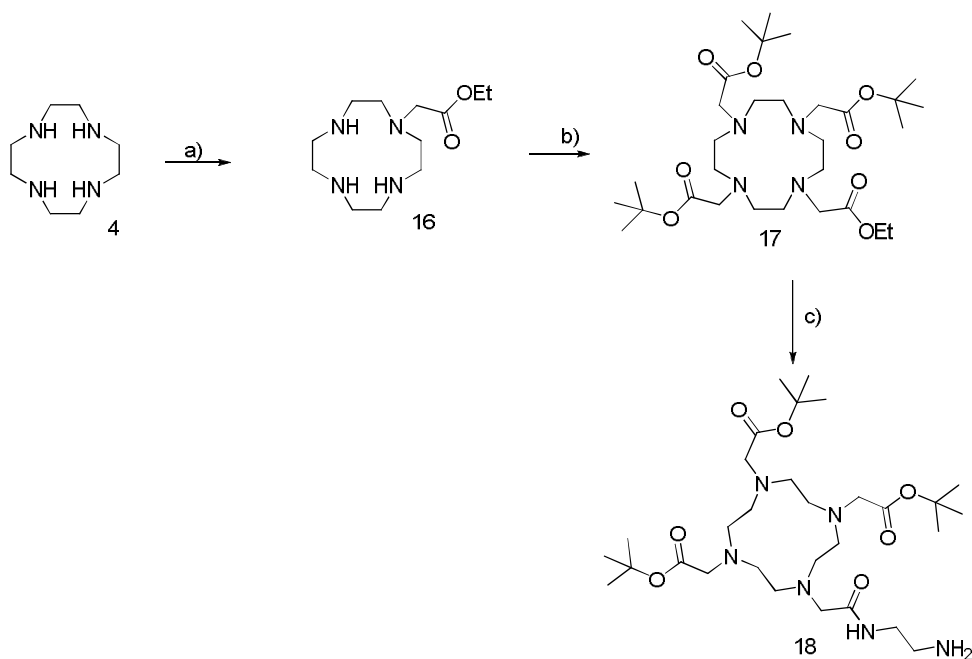


Figura 3.6- Estrutura dos ligandos DOTA-Lipoamida (**14**) e DO<sub>3</sub>A-*N*- $\alpha$ -aminopropionato-Lipoamida (**15**).

Serão também apresentados e discutidos os resultados preliminares das experiências de complexação das nanopartículas funcionalizadas com iões Lantanídeo(III).

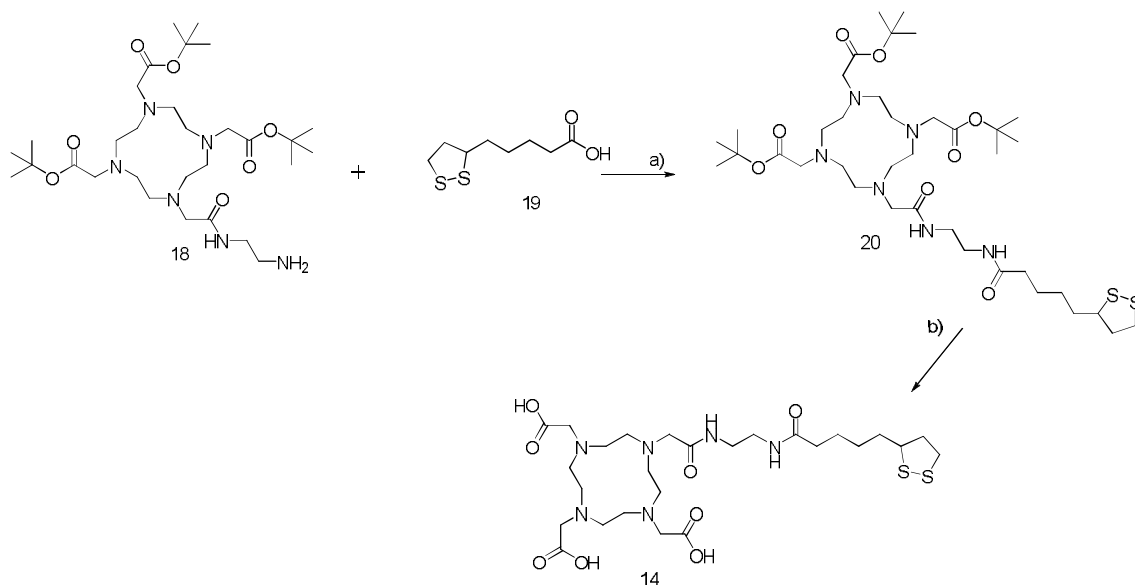
### 3.3.1 Design e síntese do agente quelante DOTA-Lipoamida (**14**)

O nosso grupo de investigação desenvolveu uma estratégia sintética para a preparação de um novo agente quelante bifuncional do tipo DOTA monoamida **18** [13], funcionalizado com um *braço* etilenodiamina pendente para acoplamento a (bio)moléculas [14] (Esquema 3.1). Este *shintão* foi usado pelo nosso grupo de investigação na síntese de glicoconjugados multivalentes endereçados para o fígado [15], e por outros autores para a construção de uma variedade conjugados [16].



Esquema 3.1- Esquema sintético para a preparação do agente quelante bifuncional DOTA-monoamida-em [14]. a) bromoacetato Etilo/DCM; b) *tert*-butilbromoacetato,  $K_2CO_3$ /MeCN c) etilenodiamina.

O acoplamento de ácidos carboxílicos  $\omega$ -tiol funcionalizados ao sintão **18** constitui um método directo para preparar agentes quelantes funcionalizados com tióis (Esquema 3.2).



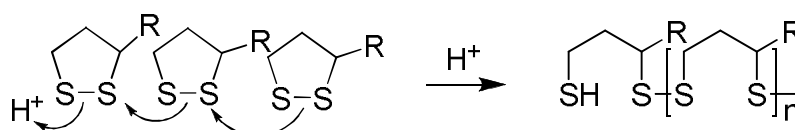
Esquema 3.2- Esquema sintético para a preparação do agente quelante  $\omega$ -tiol funcionalizado DOTA-Lipoamida. a) ácido lipóico, DCC/HOBT, DCM, b) HCl (aq).

A protecção do grupo tiol, ainda que não seja absolutamente necessária, é usualmente realizada para evitar a oxidação do tiol a dissulfeto e outras possíveis reacções secundárias [17]. O ácido lipóico (dissulfeto) **19** é particularmente apropriado para a síntese de conjugados de agentes quelantes para a preparação de nanopartículas de ouro devido à protecção inerente do tiol e à sua natureza bio-compatível – o ácido lipóico é a coenzima da enzima Piruvato Desidrogenase [17].

A síntese de amidas é usualmente realizada usando diciclohexilcarbodiimida (DCC) como activador e hidroxibenzotriazol (HOBT), como nucleófilo auxiliar. Embora este método funcione bem na maioria dos casos, fornecendo altos rendimentos de produto amida, a remoção da diciclohexilureia (DCU) que se forma e do nucleófilo auxiliar, HOBT, pode dificultar a obtenção de produtos puros. O *workup* usual de reacções de acoplamento com DCC/HOBT envolve, em primeiro lugar, a remoção da diciclohexilureia (DCU) em suspensão, formada durante o acoplamento, por filtração do *crude* reaccional. O arrefecimento prévio da mistura reaccional ajuda a maximizar a precipitação de DCU. De seguida, remove-se o solvente a pressão reduzida e volta-se a dissolver o resíduo num pequeno volume de acetato de etilo. Arrefece-se novamente a solução e filtra-se novamente. Dilui-se de seguida a solução com mais acetato de etilo e fazem-se lavagens sequenciais da fase orgânica com uma solução aquosa ácida (solução aquosa de  $\text{KHSO}_4$  ou ácido cítrico), com solução aquosa de uma base (solução aquosa de  $\text{NaHCO}_3$ ) e finalmente com solução saturada de  $\text{NaCl}$ . Este protocolo fornece usualmente o produto da reacção com um grau de pureza bastante aceitável. No entanto, com compostos do tipo *tetraaza* a aplicação deste protocolo é inviável. A quantidade de conjugado recuperado após *workup* completo, é geralmente muito pequena, devido provavelmente à extracção (perda) do conjugado para a fase aquosa durante a lavagem da fase orgânica com solução a aquosa ácida. A protonação dos átomos de azoto do esqueleto do *ciclono* em meio ácido, torna os conjugados solúveis em água. Por outro lado, se avançarmos directamente para a purificação do *crude* por cromatografia flash, na maioria das vezes o material purificado vem contaminado com DCU e HOBT. Se mesmo assim, prosseguirmos para a desprotecção do material contaminado com DCU e HOBT torna-se extremamente difícil obter um composto final puro. Um compromisso aceitável é realizar as lavagens da fase orgânica apenas com

solução alcalina e solução saturada de NaCl, ainda que se continuem a verificar perdas apreciáveis dos conjugados.

O acoplamento de ácido lipóico ao agente quelante bifuncional **18** nas condições standard, seguido de *workup* com solução aquosa de NaHCO<sub>3</sub> e solução saturada de NaCl e purificação por cromatografia flash, forneceu o conjugado **20** com rendimento aceitável, 61%. A remoção dos grupos protectores éster *tert*-butilo com HCl (3 M) forneceu o composto final pretendido **14**, na forma de hidrocloreto, com um rendimento global aceitável, 57%, no conjunto das duas etapas. Por TLC e por RMN de <sup>1</sup>H, notámos que o composto final desprotegido **14** tem tendência para polimerizar quando deixado em solução aquosa por períodos de tempo prolongados, mesmo quando guardado no frigorífico. A polimerização do ácido lipóico e dos seus conjugados é catalisada por ácido (Esquema 3.3) [18].

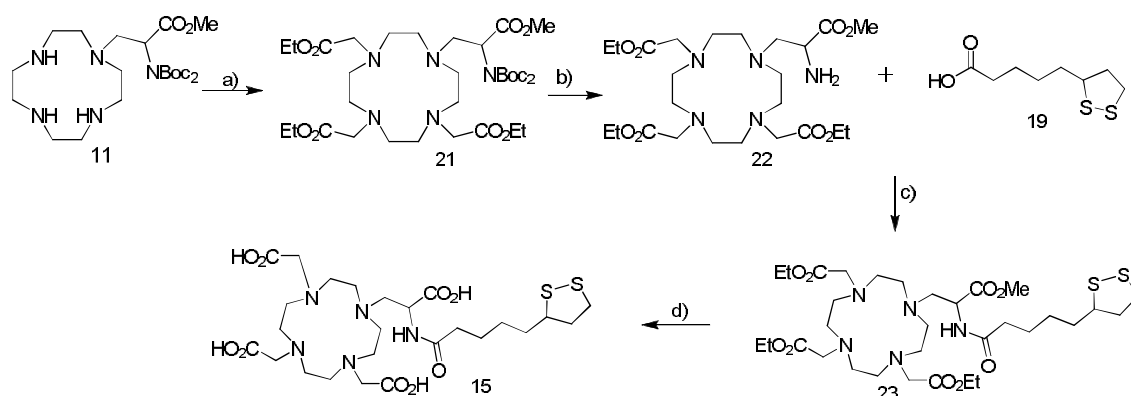


Esquema 3.3- Mecanismo proposto para a polimerização catalisada por ácido do ácido lipóico e seus conjugados [18].

Quando o hidrocloreto **14** é armazenado como sólido no frigorífico é estável por períodos longos.

### 3.3.2 Design e síntese do agente quelante DO<sub>3</sub>A-*N*- $\alpha$ -aminopropionato-Lipoamida (**15**)

Nesta secção vamos analisar a estratégia seguida para a síntese do conjugado DO<sub>3</sub>A-*N*- $\alpha$ -aminopropionato-Lipoamida **15** (Esquema 3.4).



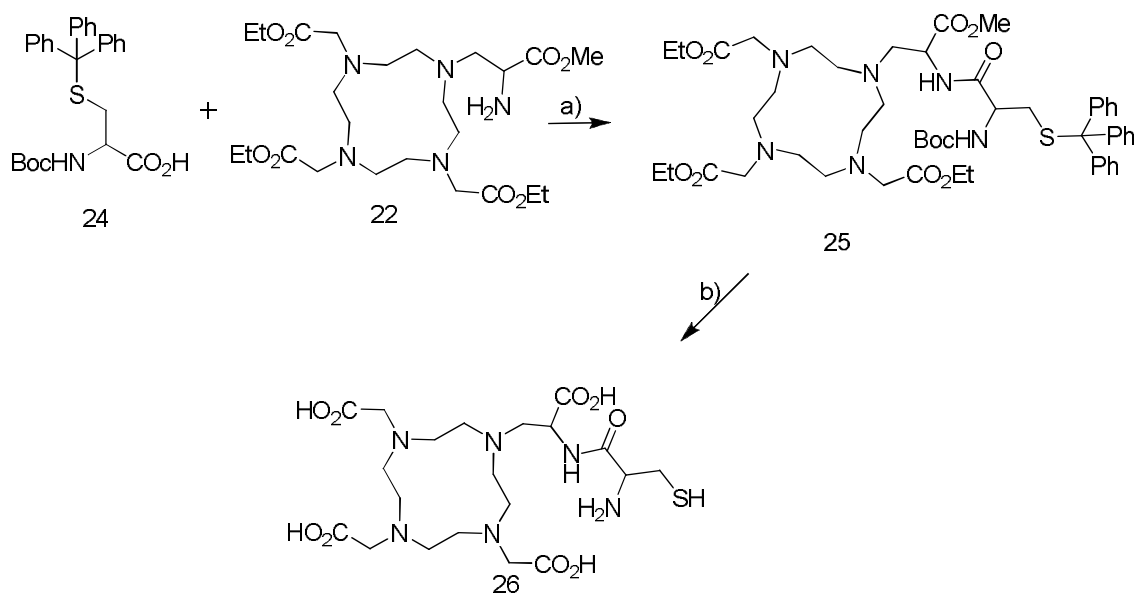
Esquema 3.4– Esquema sintético para a preparação do ligando  $\omega$ -tiol funcionalizado DO<sub>3</sub>A-N- $\alpha$ -aminopropionato-Lipoamida, a) bromoacetato de etilo, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/MeCN b) TFA, DCM; c) ácido lipóico, DCC/HOBT, DCM d) i. HCl (aq), ii. Dowex 1X2 HO<sup>-</sup>, iii) eluição com HCl 0,1 M

O intermediário com protecção ortogonal **21** pode ser selectivamente desprotegido com ácido, libertando o grupo amina para acoplamento a fragmentos orgânicos. O intermediário **21** foi tratado com uma solução de ácido trifluoroacético (TFA, 10% em diclorometano) desprotegendo selectivamente o grupo amina. No espectro de RMN de <sup>1</sup>H do composto **22** não se observa o sinal atribuído ao grupo *tert*-butilo oxycarbonilo (Boc) no espectro do composto **21**. O acoplamento do ácido lipóico ao sintão **22** foi realizado nas mesmas condições que as descritas para a preparação do agente quelante DOTA-Lipoamida, DCC/HOBT. Antes de adicionar os reagentes de acoplamento e o ácido lipóico é necessário ajustar o pH da solução do composto **22**, para pH 9-10, por adição de uma base não nucleofílica, trietilamina ou diisopropiletilamina. Durante o *workup* fizeram-se apenas as lavagens com solução aquosa de NaHCO<sub>3</sub> e com solução saturada de cloreto de sódio para tentar minimizar as perdas de composto. O crude foi purificado por cromatografia flash tendo-se obtido um conjugado, com um grau de pureza aceitável, com um rendimento de 44%. A desprotecção total do composto **23** obtido no passo anterior, foi efectuada hidrolisando os grupos protectores éster etílico e éster metílico com Dowex 1X2-100 OH<sup>-</sup>, seguido de eluição com HCl (0,1 M). Obteve-se um produto impuro, com duas manchas no TLC, com um rendimento global de 20%. Análise por espectrometria de massa (ESI) confirma que se trata do composto pretendido e do respectivo dímero, resultante da dimerização do fragmento ácido lipóico. Foram realizadas várias

tentativas para purificar a mistura impura por cromatografia de fase reversa em Sílica Gel  $\text{RPC}_8$  com eluição em gradiente (100% água  $\rightarrow$  100% etanol). Conseguimos obter algumas fracções de produto (monómero) puro para testar a formação de nanopartículas. A polimerização, catalisada por ácido, pode ocorrer durante a eluição da resina com HCl aquoso e durante a evaporação (concentração) das fracções provenientes da coluna.

É também interessante notar que o conjugado  $\text{DO}_3\text{A-N-}\alpha$ -aminopropionato-Lipoamida é muito mais sensível a reacções de polimerização que o ligando DOTA-Lipoamida.

A via sintética desenvolvida para a preparação do ligando  $\text{DO}_3\text{A-N-}\alpha$ -aminopropionato-Lipoamida, forneceu material suficiente para testar a preparação de nanopartículas de ouro funcionalizadas com o agente quelante  $\text{DO}_3\text{A-N-}\alpha$ -aminopropionato-Lipoamida. Para evitar os problemas resultantes da polimerização do ácido lipóico, decidimos testar o acoplamento do *shintão* **22** com o derivado protegido de cisteína, *N*-Boc,*S*-Tritil-*L*-cisteína **24** (Esquema 3.5).



Esquema 3.5- Esquema sintético para a preparação do agente quelante  $\omega$ -tiol funcionalizado  $\text{DO}_3\text{A-N-}\alpha$ -aminopropionato-Cisteína a) *N*-Boc,*S*-Tritil-*L*-cisteína, DCC/HOBT, DCM b) i. HCl (aq), ii. Dowex 1X2  $\text{HO}^-$ , iii) eluição com HCl 0,1 M

Os resultados preliminares, especialmente a espectrometria de massa indicam que esta via sintética fornece o composto final com um rendimento global aceitável,

63%. Contudo, o produto final vem contaminado com o ligando DO<sub>3</sub>A **27** (Figura 3.7). Este produto, é gerado, provavelmente, durante a reacção de alquilação do intermediário monoalquilado **11** por retroadição de Michael do intermediário **21** (Esquema 3.4) e transportado, devido a purificação deficiente, para a reacção seguinte. A purificação do conjugado final desprotegido **26** revelou-se muito difícil. É portanto crucial obter o intermediário **21** puro (Esquema 3.4). Deverá ser possível minimizar a reacção de retroadição de Michael, durante a segunda reacção de alquilação, através da optimização das condições reaccionais: solvente, base, agente alquilante, razão molar dos reagentes, temperatura, tempo de reacção.

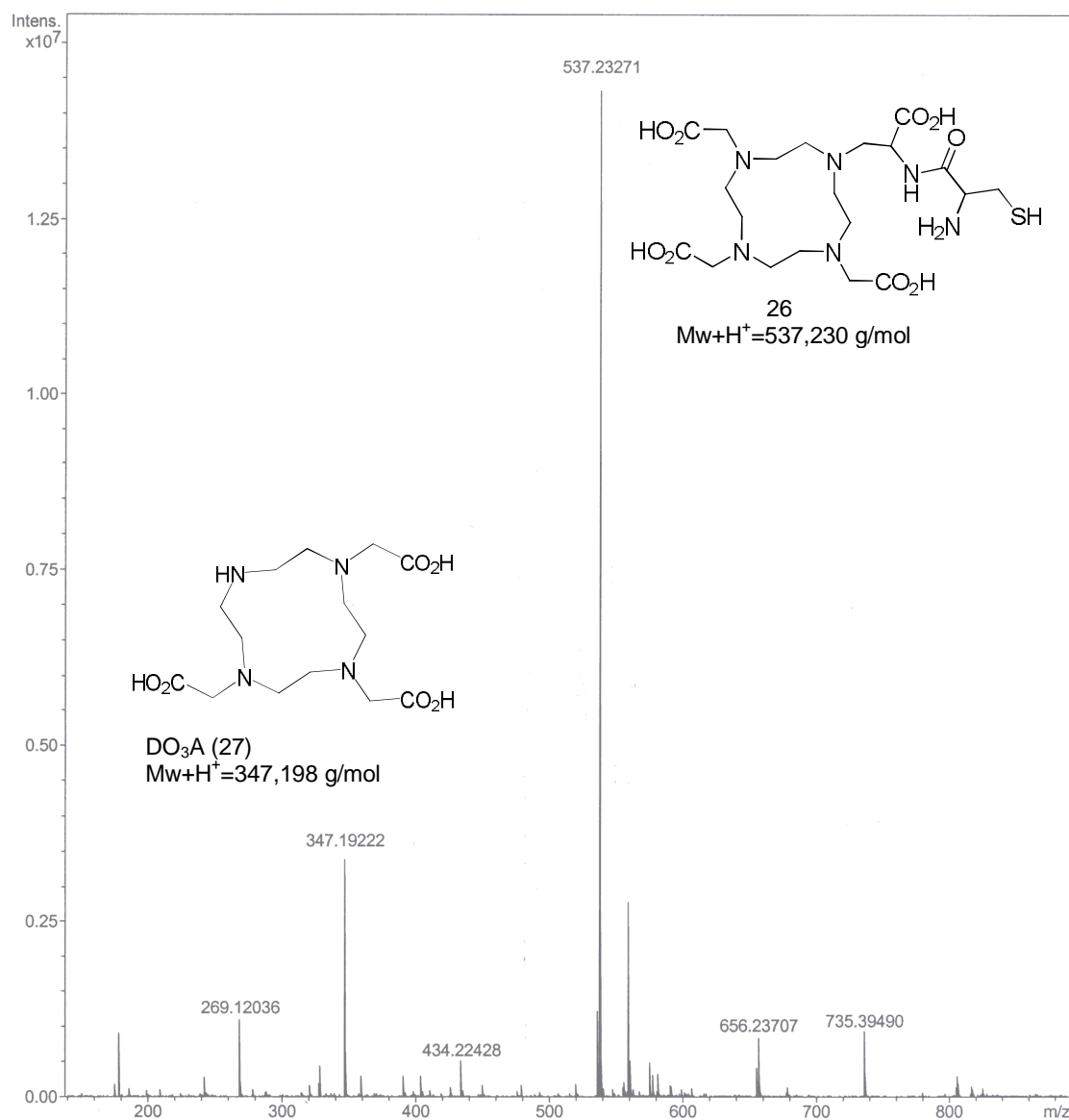


Figura 3.7- Espectro de massa ESI do composto DO<sub>3</sub>A-*N*-α-aminopropionato-cisteína

Apesar das dificuldades encontradas esta via sintética é muito promissora para a síntese de conjugados do complexo DO<sub>3</sub>A-*N*- $\alpha$ -aminopropionato.

### **3.3.3 Preparação de nanopartículas de ouro funcionalizadas com o ligando DOTA-Lipoamida pelo método de substituição: estudo por UV-Vis.**

O primeiro método testado para a funcionalização de nanopartículas de ouro com agentes quelantes foi o *método de substituição*- substituição do ião *tris*-citrato, pelo ligando DOTA-Lipoamida, em nanopartículas de ouro estabilizadas com citrato [19]. Utilizamos uma solução de nanopartículas de ouro estabilizadas com citrato, preparadas pelo método de redução de HAuCl<sub>4</sub> (aq.) com *tris*-citrato de sódio [20]. As amostras de ouro, 1 cm<sup>3</sup> a pH 7,2, foram adicionados volumes crescentes de solução do complexo Gd(DOTA-Lipoamida) (10 mM, pH 7,2), em porções de 20  $\mu$ L. Este estudo foi realizado a duas temperaturas diferentes, a 25 °C e a 37 °C. O efeito da adição do complexo na *banda plasmónica do ouro* foi seguido por espectroscopia de UV-Vis.

Por adição do complexo Gd(DOTA-Lipoamida) à solução de nanopartículas de ouro estabilizadas com citrato verifica-se um aumento de intensidade da *banda plasmónica do ouro* e um desvio para comprimentos de onda superiores (Figura 3.8). A intensidade máxima é obtida por adição de 20  $\mu$ L de solução de complexo. A adição de volumes superiores de ligando leva a uma pequena diminuição da intensidade da *banda plasmónica do ouro* devido provavelmente ao efeito de diluição. O aumento de intensidade e o desvio batocrómico da *banda plasmónica do ouro* por adição de ligando, indica que ocorreu substituição de citrato pelo complexo Gd(DOTA-Lipoamida) na superfície das nanopartículas. A intensidade e o comprimento de onda do máximo de absorção da *banda plasmónica do ouro*, é muito sensível a alterações do índice de refração na superfície das nanopartículas em solução. Este fenómeno constitui a base da técnica analítica *Surface Plasmon Resonance* [21].



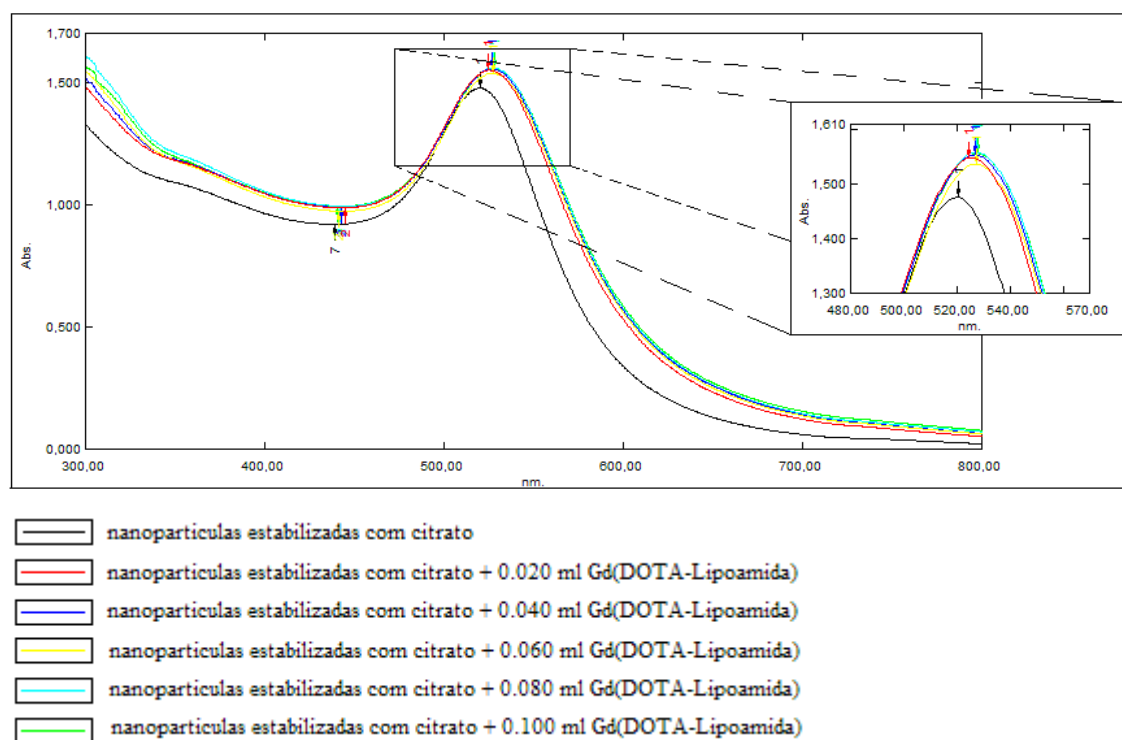


Figura 3.8- Espectros de UV-Vis de soluções de nanopartículas de ouro estabilizadas com citrato, após adição de volumes crescentes de solução do complexo Gd(DOTA-Lipoamida). Espectros obtidos imediatamente após a adição do complexo.

Para as amostras mantidas sob agitação a 37 °C durante 2 horas verificam-se algumas alterações nos espectros de UV-Vis (Figura 3.9).

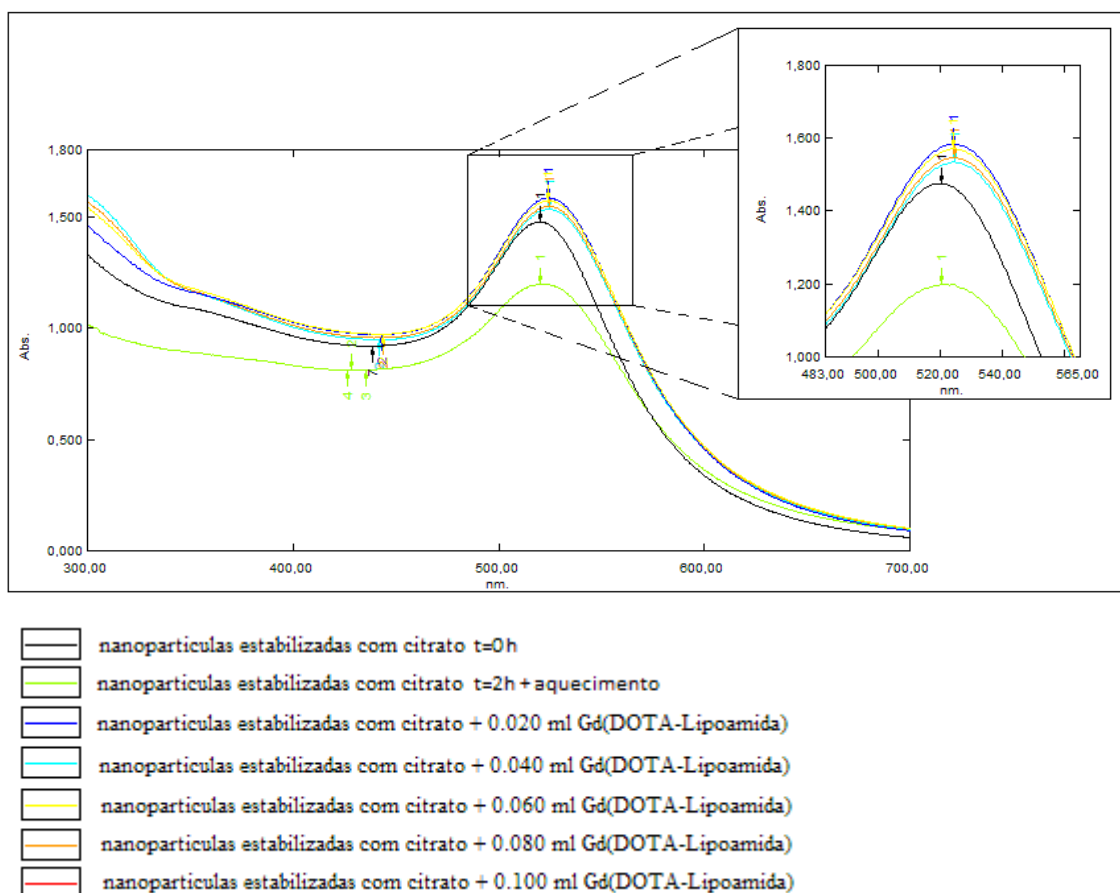


Figura 3.9- Espectros de UV-Vis de soluções de nanopartículas de ouro estabilizadas com citrato, após adição de volumes crescentes de solução do complexo Gd(DOTA-Lipoamida). As amostras foram mantidas sob agitação a 37 °C durante 2 horas.

A alteração mais significativa é o decréscimo da intensidade da *banda plasmónica* do ouro na amostra de nanopartículas estabilizadas com citrato. Em relação às outras amostras ocorre uma ligeira alteração, pouco significativa, na intensidade máxima da banda plasmónica. Em relação às amostras que permaneceram sob agitação à temperatura de 25 °C (Figura 3.10) existe uma pequena variação no valor máximo de intensidade da *banda plasmónica*, sendo que a maior alteração se verifica na amostra à qual foi adicionada 40 µL de ligando.

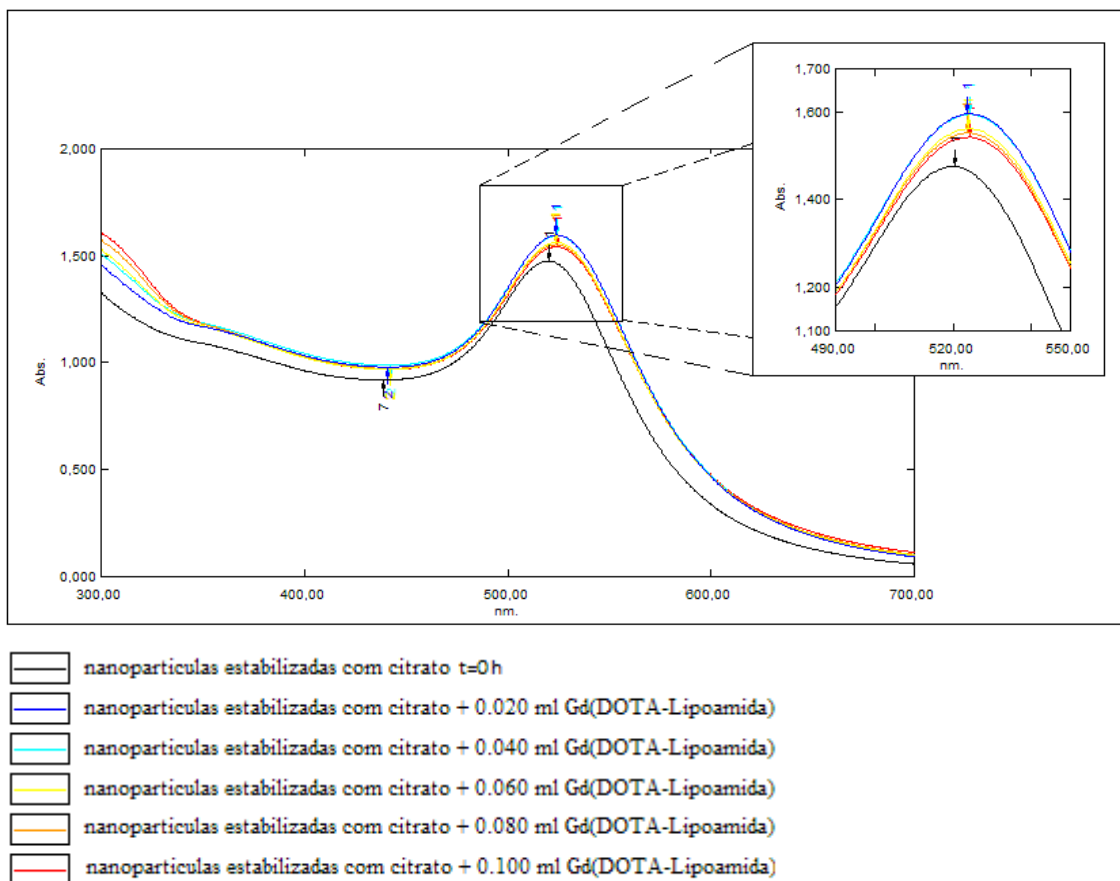


Figura 3.10- Espectros de UV-Vis de soluções de nanopartículas de ouro estabilizadas com citrato, após adição de volumes crescentes de solução do complexo Gd(DOTA-Lipoamida). As amostras foram mantidas sob agitação a 25 °C durante 2 horas.

A evolução das nanopartículas foi seguida por UV-Vis durante 24 horas, verificando-se que os resultados não eram muito diferentes dos obtidos ao fim de 2 horas.

Os estudos de UV-Vis indicam que ocorre substituição de citrato pelo complexo Gd(DOTA-Lipoamida) devido ao desvio do máximo de absorção da banda plasmónica para um comprimento de onda mais alto e ao aumento da respectiva intensidade.

### 3.3.4 Preparação de nanopartículas de ouro funcionalizadas com o ligando DOTA-Lipoamida pelo método de substituição: estudo relaxométrico

Os quelatos anfifílicos de  $Gd^{3+}$  funcionam como surfactantes em solução aquosa, isto é, formam estruturas supramoleculares (micelas, bicamadas, etc) através de um processo de automontagem, *selfassembly* [22]. A formação de micelas é caracterizada pela concentração micelar crítica (*cmc*), que é a concentração mínima de composto anfifílico para a qual se formam micelas em solução. Determinou-se o valor de *cmc* para o complexo Gd(DOTA-Lipoamida) através de medições de relaxação protónica paramagnética longitudinal (20 MHz a 25 °C). Este procedimento está bem estabelecido para sistemas paramagnéticos micelares, baseando-se na variação da relaxação paramagnética longitudinal da água com o aumento da concentração do quelato de  $Gd^{3+}$ . Concretamente, a formação de micelas resulta num tempo de correlação rotacional,  $\tau_R$ , mais elevado e consequentemente num aumento da relaxividade. Abaixo do *cmc*, não há a formação de agregados, e portanto, apenas os quelatos monoméricos contribuem para a relaxação paramagnética da água (equação 3.1) [24].

$$R_1^{obs} - R_1^D = r_1^{n.a} \times C_{Gd} \quad (\text{equação 3.1})$$

Nesta equação  $R_1^D$  representa a contribuição diamagnética para a relaxação protónica longitudinal (relaxação da água pura),  $r_1^{n.a}$  representa a relaxividade do quelato não agregado, livre (em  $mM^{-1} s^{-1}$ ), e  $C_{Gd}$  é a concentração analítica de  $Gd^{3+}$ .

Acima do *cmc*, a relaxação medida é a soma de duas contribuições, uma devido ao quelato monomérico e a outra devido à forma agregada (micelas). A relaxação protónica medida para a solução paramagnética pode ser expressa pela equação 3.2, onde  $r_1^a$  é a relaxividade da forma micelar.

$$R_1^{obs} - R_1^a = (r_1^{n.a} - r_1^a)cmc + r_1^a + C_{Gd} \quad (\text{equação 3.2})$$

O *cmc* pode portanto ser determinado a partir do gráfico de velocidade de relaxação paramagnética em função da concentração de  $Gd^{3+}$ , como mostrado na Figura 3.11

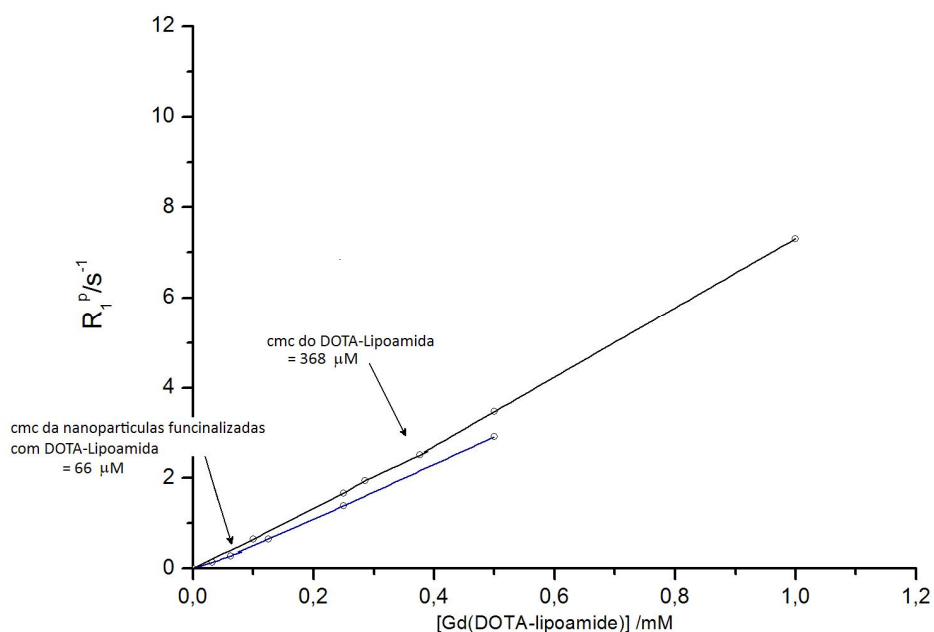


Figura 3.11- Gráfico de  $R_1^p$  em função da concentração do complexo Gd(DOTA-Lipoamida) na presença e na ausência de nanopartículas de ouro estabilizadas com citrato. Apresenta-se também a determinação do valor de *cmc* para o complexo Gd(DOTA-Lipoamida) a 25 °C, 20MHz.

A partir deste gráfico é possível obter os valores para as velocidades de relaxação das duas formas, agregada e não agregada, acima e abaixo do *cmc*, respectivamente. Os valores obtidos para o complexo Gd(DOTA-Lipoamida) foram  $r_1^{n.a} = 6,72 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$  e  $r_1^a = 7,68 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (a 20 MHz e 25 °C). O valor calculado para o *cmc* do complexo Gd(DOTA-Lipoamida) foi de  $cmc = 0,37 \pm 0,02 \text{ mM}$ . Este valor de *cmc* é da mesma ordem de grandeza do valor obtido para o complexo Gd(EPTPA-C16) ( $0,34 \pm 0,02 \text{ mM}$ ) [23]. Este resultado é surpreendente, uma vez que o complexo Gd(DOTA-Lipoamida) tem uma cadeia hidrocarbonada mais curta e para além disso tem uma ligação amida, mais polar que a ligação éster. Por outro lado o complexo Gd(EPTPA-C16) tem carga negativa, o que poderá dificultar o *empacotamento* dos quelatos monoméricos na estrutura da micela devido a repulsão electrostática.

Deveria ser possível seguir por relaxometria o processo de *substituição* de citrato pelo complexo Gd(DOTA-Lipoamida) em nanopartículas de ouro estabilizadas com citrato. Para concentrações de complexo abaixo do *cmc*, teríamos em solução complexo livre em equilíbrio com complexo ligado às nanopartículas. Para concentrações acima do *cmc* teríamos potencialmente três espécies em equilíbrio em solução; o complexo na forma livre (com uma concentração igual ao *cmc*), micelas do complexo e complexo ligado às nanopartículas. Abaixo do *cmc* seria de esperar uma relaxividade mais alta na presença do que na ausência de nanopartículas, devido ao presumível aumento do tempo de correlação rotacional,  $\tau_R$ , resultante da ligação do complexo Gd(DOTA-Lipoamida) ao núcleo metálico. Acima do *cmc* a situação é mais complexa devido à coexistência de três espécies em solução: forma livre (não agregada), forma ligada às nanopartículas e forma agregada (micelar).

Adicionaram-se volumes crescentes de solução de Gd(DOTA-Lipoamida) em água (10 mM, pH 7,2) a 1,5 cm<sup>3</sup> de solução de nanopartículas em água (pH 7,2) a 25 °C e mediu-se a variação do tempo de relaxação longitudinal em função da concentração de Gd<sup>3+</sup> adicionado (Figura 3.11). Na realidade, a relaxividade é muito semelhante, na presença e na ausência de nanopartículas, na gama de concentrações de complexo estudadas. Provavelmente, a diferença de relaxividade entre a forma livre e ligada às nanopartículas do complexo Gd(DOTA-Lipoamida) é muito pequena, à semelhança do que acontece com a diferença de relaxividade entre as formas agregada e não agregada do complexo em solução. Os complexos do tipo DTPA-bisamida reportados por *Deboutière* [9] e *Park* [10] também apresentam relaxividades muito similares em solução e quando ligados a nanopartículas de ouro.

### **3.3.5 Síntese de nanopartículas de ouro funcionalizadas via redução de Au<sup>3+</sup> na presença do ligando DOTA-Lipoamida.**

Após os resultados pouco conclusivos que obtivemos pelo *método de substituição*, decidimos preparar nanopartículas estabilizadas com o ligando DOTA-Lipoamida pelo método de *Brust*. A complexação das nanopartículas, funcionalizadas com agente quelante, com Gd<sup>3+</sup>, permitiria preparar em dois passos, nanopartículas funcionalizadas com quelatos de Gd<sup>3+</sup> para uso como Agentes de Contraste para IRM.

O método de *Brust*, consiste na redução de uma solução aquosa de ácido tetracloroaurico ( $\text{HAuCl}_4$ ) na presença do ligando tiol, no nosso caso o agente quelante DOTA-Lipoamida, por adição de uma solução aquosa de borohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ). Verifica-se de forma quase instantânea a formação de uma solução de tonalidade vermelha escura, característica de nanopartículas de ouro. No primeiro passo, a adição do ligando tiol à solução aquosa de  $\text{Au}^{3+}$  gera soluções coradas devido à formação de complexos Au-tiol. Alguns autores usam misturas metanol/água para a síntese de nanopartículas pelo método de *Brust* [7]. No nosso caso não usamos qualquer co-solvente orgânico. Uma vez que o ligando DOTA-Lipoamida se encontrava na forma hidrocloreto, a mistura ligando/ $\text{HAuCl}_4$  gera directamente uma solução ácida, pH ~ 1,5-2,0, sem que haja necessidade de ajustar o pH pela adição de ácido. Foram preparadas várias amostras de nanopartículas de ouro estabilizadas com o ligando DOTA-Lipoamida com diferentes razões molares  $\text{Au}^{3+}$  : DOTA-Lipoamida : borohidreto de sódio 1 : 1 : 1, 1 : 2 : 1, 1 : 3 : 1 e 1 : 5 : 1 (Tabela 3.1).

Tabela 3.1- Condições usadas para a preparação de nanopartículas de ouro funcionalizadas com o agente quelante DOTA-Lipoamida.

Amostra	[ $\text{HAuCl}_4$ ]aq. 14,7 $\mu\text{mol}/\text{cm}^3$	[DOTA-Lipoamida]aq. 14,7 $\mu\text{mol}/\text{cm}^3$	$\text{NaBH}_4$ (aq). 132,0 $\mu\text{mol}/\text{cm}^3$	Concentração final do ligando ( $\mu\text{mol}/\text{cm}^3$ )
1:1:1	0,5 $\text{cm}^3$	0,5 $\text{cm}^3$	0,056 $\text{cm}^3$	2,45
1:2:1	0,5 $\text{cm}^3$	1,0 $\text{cm}^3$	0,056 $\text{cm}^3$	4,90
1:3:1	0,5 $\text{cm}^3$	1,5 $\text{cm}^3$	0,056 $\text{cm}^3$	7,35
1:5:1	0,5 $\text{cm}^3$	2,5 $\text{cm}^3$	0,056 $\text{cm}^3$	12,25

Através de análise do espectro de UV-Vis das amostras após 1 hora de agitação à temperatura ambiente é possível verificar que se já começa a evidenciar a *banda plasmónica*, característica das nanopartículas de ouro (Figura 3.12). É ainda de realçar que a razão molar  $\text{Au}^{3+}$  : ligando 1 : 2 é a que mais se evidencia na fase inicial da preparação das nanopartículas. A formação das nanopartículas foi seguida por UV-Vis durante os três dias seguintes.

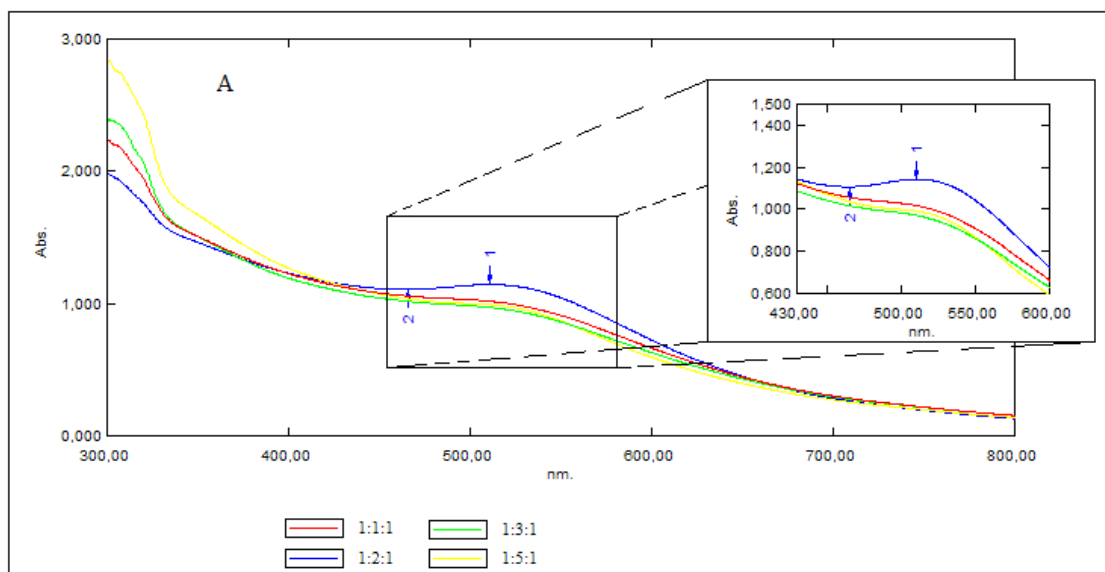


Figura 3.12- de UV-Vis das amostras de nanopartículas de ouro funcionalizadas com o agente quelante DOTA-Lipoamida após 1 hora sob agitação à temperatura ambiente (25 °C).

Ao fim de três dias verificamos que as amostras já não apresentavam grandes alterações no espectro de UV-Vis (Figura 3.13). A amostra com a razão molar  $\text{Au}^{3+}$ : ligando 1:5 foi a que evidenciou a *banda plasmônica* melhor definida, e em que a cor mais se assemelhava com a da solução de nanopartículas estabilizadas com citrato. O tamanho e a distribuição de tamanhos das nanopartículas foram determinados por estudos de *Dynamic Light Scattering* (DLS) (Figura 3.14).

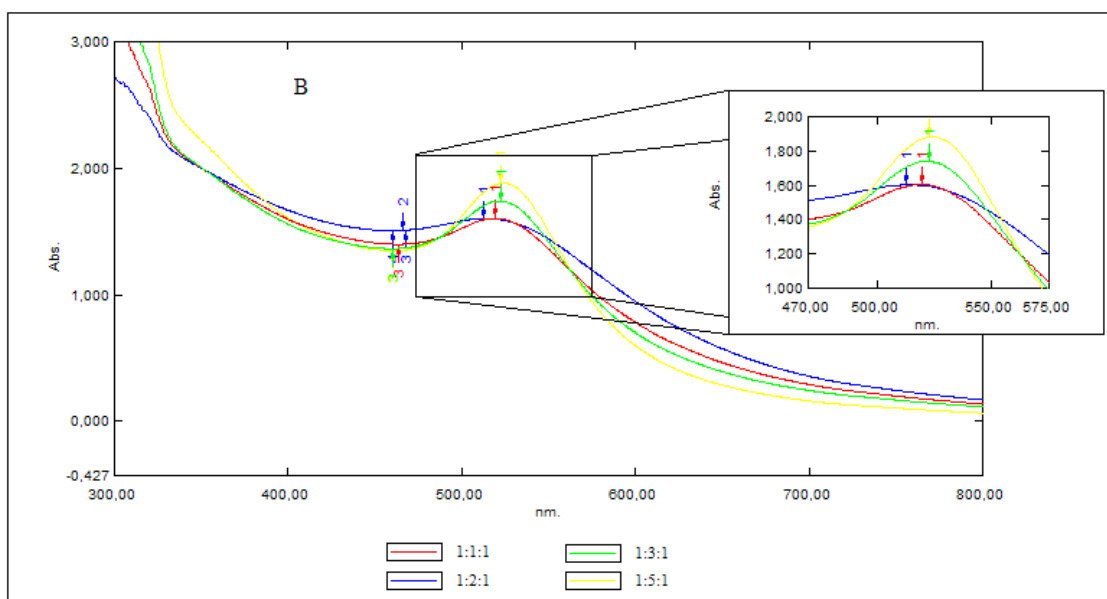


Figura 3.13- Espectros de UV-Vis das amostras de nanopartículas de ouro funcionalizadas com o ligando DOTA-Lipoamida após 3 dias de agitação à temperatura ambiente, 25 °C.



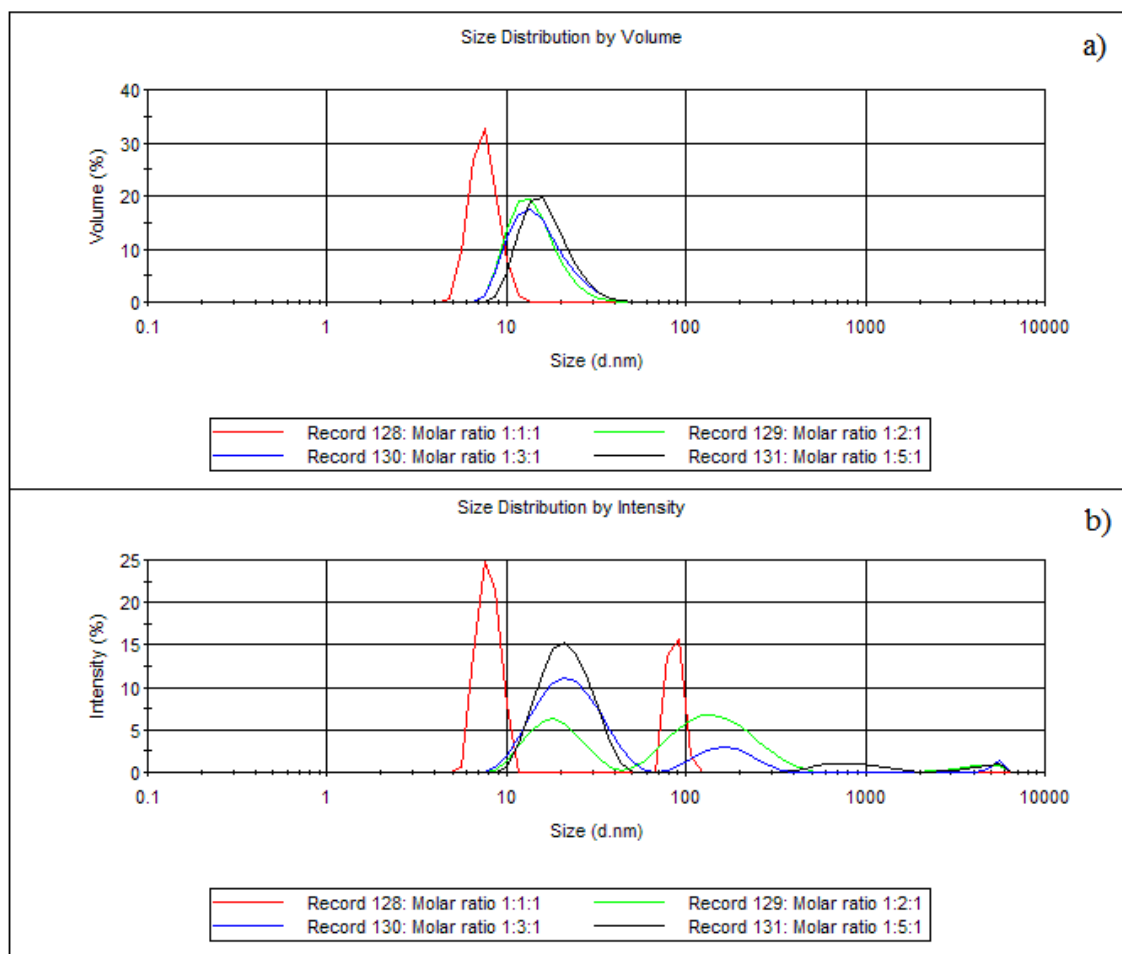


Figura 3.14- Curvas de distribuição do diâmetro (DLS) das nanopartículas de ouro funcionalizadas com o ligando DOTA-Lipoamida em função do volume, **a)**, e da intensidade, **b)**.

Tabela 3.2- Valores obtidos a partir das curvas de distribuição de tamanhos das amostras de nanopartículas de ouro funcionalizadas com DOTA-Lipoamida, determinadas por DLS.

Razão molar $\text{Au}^{3+}/\text{DOTA-Lipoamida}/\text{NaBH}_4$	Z-Ave (d.nm)	Pdl	Diâmetro (nm) (%volume)	Diâmetro (nm) (%Intensidade)
1:1:1	756	0,682	7,57 (100%)	7,97 (68,7%) 86,7 (31,3%)
1:2:1	46	0,528	14,6 (99,1%)	19,3 (37,2%) 158 (58,95%)
1:3:1	25,8	0,439	15,6 (99,9%)	23,3 (80,1%) 171 (18,1%)
1:5:1	22,7	0,275	16,9 (99,8%)	22,1 (89,3%) 861 (7,4%)

Os resultados de medições de DLS podem ser apresentados na forma de gráficos de: número de partículas vs diâmetro; volume vs diâmetro ou intensidade vs diâmetro. Por exemplo, numa solução em que exista um número igual de partículas de 5 nm e de 50 nm, num gráfico de número de partículas vs diâmetro obtêm-se dois picos na proporção de 1 para 1. Num gráfico de volume vs diâmetro obtêm-se dois

picos na proporção de 1 para 1 000 uma vez que as partículas de 50 nm ocupam um volume 1 000 vezes superior às de 5 nm (volume de uma esfera é  $4/3\pi(r)^3$ ). Num gráfico de intensidade vs diâmetro obtêm-se dois picos com intensidades relativas de 1 para 1 000 000, uma vez que as partículas maiores dispersão mais luz, e segunda a aproximação de *Rayleigh* a intensidade de dispersão das partículas tem uma dependência de  $10^6$  em relação ao seu diâmetro [24].

Os gráficos de intensidade vs diâmetro indicam que em todas as preparações de nanopartículas há vários grupos de nanopartículas, picos, com diâmetros diferentes (Tabela 3.2). Por outro lado, as curvas de distribuição de volume apresentam apenas um pico. A análise de distribuição de intensidades sobrevaloriza as partículas grandes. Considerámos pois, que a análise da distribuição de volume era apropriada para descrever a distribuição de tamanhos das nanopartículas.

As partículas mais abundantes, em cada solução, têm tamanhos entre 7,56 – 16,9 nm. As nanopartículas sintetizadas com a razão molar  $\text{Au}^{3+}$  : ligando 1 : 1 são as que apresentam o tamanho mais pequeno (Tabela 3.2).

Posteriormente foram preparados duas amostras com razão molar  $\text{Au}^{3+}$ :DOTA-Lipoamida: $\text{NaBH}_4$  1:5:1 (Tabela 3.1): após redução, uma das amostras foi mantida sob agitação à temperatura ambiente durante 1 hora e deixada depois sob agitação a 50 °C. A outra amostra foi mantida sob agitação à temperatura ambiente, 25 °C. Pela análise dos dados de UV-Vis (Figura 3.15) observa-se um aumento significativo na intensidade da *banda plasmónica* na amostra aquecida a 50 °C, relativamente ao observado na amostra que ficou sob agitação à temperatura ambiente.

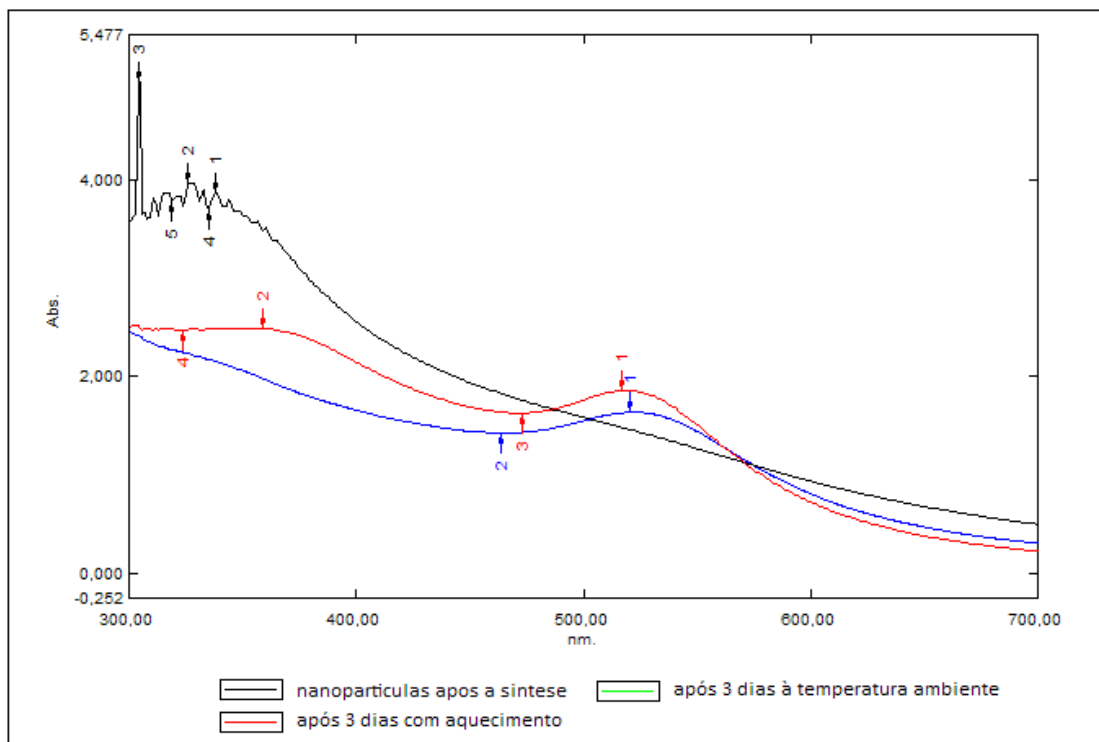


Figura 3.15- Espectros de UV-Vis das amostras de nanopartículas de ouro funcionalizadas com DOTA-Lipoamida: 30 minutos após a adição do agente redutor, após 3 dias sob agitação à temperatura ambiente e após 3 dias sob agitação a 50 °C.

Por DLS é possível verificar uma diferença significativa no tamanho das nanopartículas. A amostra que ficou sob agitação à temperatura ambiente apresenta nanopartículas com um tamanho de 15,4 nm enquanto que a amostra mantida sob aquecimento a 50 °C apresenta nanopartículas com 6,25 nm (Figura 3.16; Tabela 3.3).

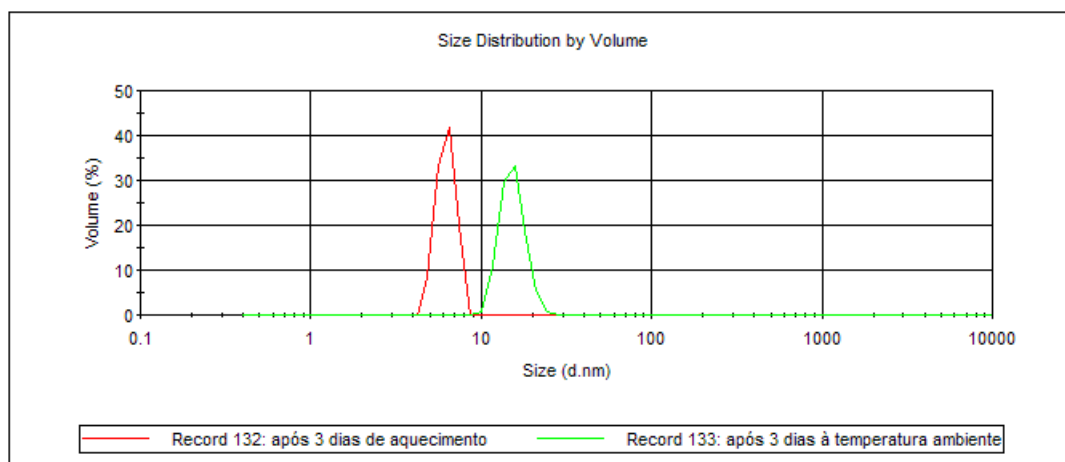


Figura 3.16- Curvas de distribuição de diâmetros (DLS) de nanopartículas de ouro funcionalizadas com o agente quelante DOTA-Lipoamida, após 3 dias sob agitação a 50 °C e após 3 dias sob agitação à temperatura ambiente.

Tabela 3.3- Valores obtidos a partir das curvas de distribuição de tamanhos de DLS para as amostras de nanopartículas de ouro funcionalizadas com DOTA-Lipoamida após 3 dias a 50°C e a 25 °C.

Amostra	Z-Ave (d.nm)	Pdl	Diâmetro (nm) (%volume)
Após 3 dias a 50 °C	972	0,837	6,25 (99,9%)
Após 3 dias à temperatura ambiente	73,3	0,692	15,4 (99,1%)

Destes resultados podemos concluir que a temperatura é um factor importante a ter em conta na produção de nanopartículas de ouro funcionalizadas o agente quelante DOTA-Lipoamida.

### 3.3.6 Síntese de nanopartículas de ouro funcionalizadas com o agente quelante DO<sub>3</sub>A-*N*- $\alpha$ -aminopropionato-Lipoamida

Voltámos a utilizar o método de *Brust* para a síntese das nanopartículas de ouro funcionalizadas com o ligando DO<sub>3</sub>A-*N*- $\alpha$ -aminopropionato-Lipoamida. Para estudar o efeito da razão molar Au<sup>3+</sup> : DO<sub>3</sub>A-*N*- $\alpha$ -aminopropionato-Lipoamida no tamanho das nanopartículas usamos apenas as razões molares 1 : 2 : 1 e 1 : 5 : 1 devido à quantidade reduzida de ligando disponível (Tabela 3.4).

Tabela 3.4- Condições usadas para a preparação de nanopartículas de ouro funcionalizadas com o agente quelante DO<sub>3</sub>A-*N*- $\alpha$ -aminopropionato-Lipoamida

Amostra	Vol. [HAuCl <sub>4</sub> ]aq. (7,3 $\mu$ mol/cm <sup>3</sup> )	Vol. de [DO <sub>3</sub> A- <i>N</i> - $\alpha$ -aminopropionato-Lipoamida] (aq.) (7,3 $\mu$ mol/cm <sup>3</sup> )	Vol. de NaBH <sub>4</sub> (aq.) (70,0 $\mu$ mol/cm <sup>3</sup> )	Concentração final do ligando ( $\mu$ mol/cm <sup>3</sup> )
1:2:1	1,0 cm <sup>3</sup>	2,0 cm <sup>3</sup>	0,056 cm <sup>3</sup>	4,87
1:5:1	0,5 cm <sup>3</sup>	2,5 cm <sup>3</sup>	0,056 cm <sup>3</sup>	6,08

Após adição do agente redutor, as nanopartículas foram mantidas sob agitação à temperatura ambiente durante 24 horas e colocadas depois numa incubadora orbital a 50 °C durante 3 dias.

Para a amostra com razão molar 1 : 2 : 1 o espectro de UV-Vis obtido com as nanopartículas estabilizadas com o agente quelante DO<sub>3</sub>A-*N*- $\alpha$ -aminopropionato-Lipoamida é muito diferente do obtido com as nanopartículas funcionalizadas com o

agente quelante DOTA-Lipoamida (Figura 3.17). A *banda plasmônica do ouro* só se torna evidente por diluição da amostra. Na amostra diluída 12 vezes a *banda plasmônica do ouro* é relativamente pouco intensa e mal definida em comparação com as nanopartículas funcionalizadas com o ligando DOTA-Lipoamida (Figura 3.12). Em relação à amostra preparada com a razão molar 1 : 5 : 1 não se consegue identificar a *banda plasmônica do ouro*.

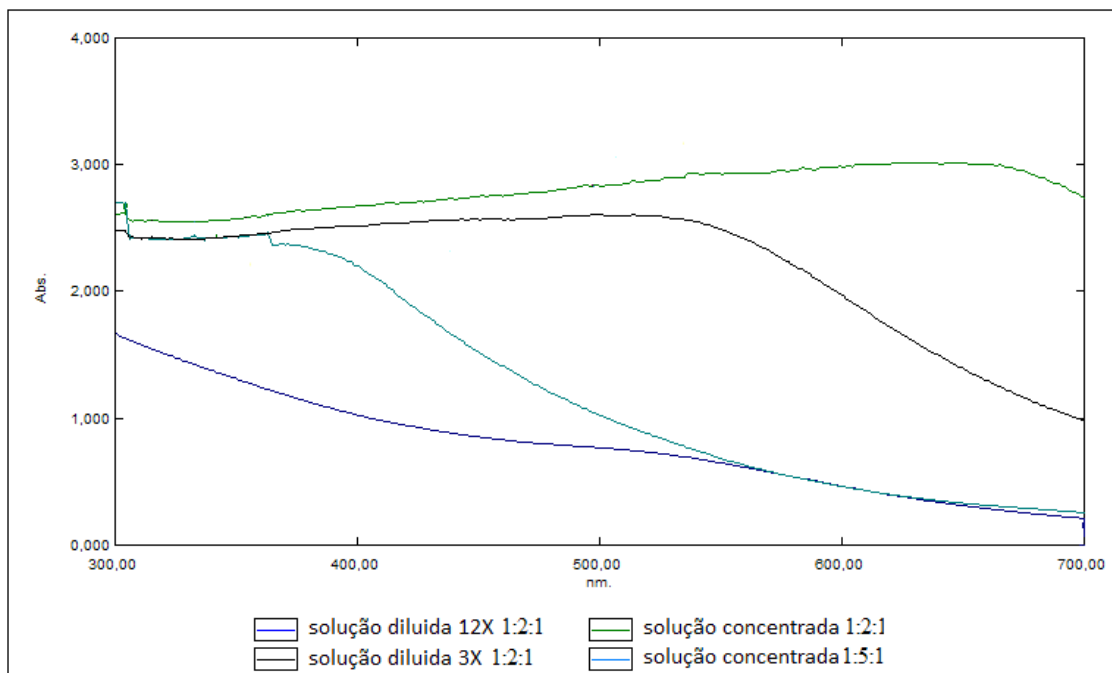


Figura 3.17- Espectros de UV-Vis para as amostras de nanopartículas de ouro funcionalizadas com o ligando DO<sub>3</sub>A-*N*- $\alpha$ -aminopropionato-Lipoamida nas proporções 1:5:1 e 1.2:1.

Estudos de DLS revelaram que as nanopartículas formadas com a razão molar Au:Ligando 1:2, apresentavam tamanhos na ordem dos 6 - 8 nm, enquanto que as nanopartículas formadas com a razão molar Au:Ligando 1:5 eram muito pequenas, com diâmetro entre 0,6 e 0,7 nm (Figura 3.18; Tabela 3.5).

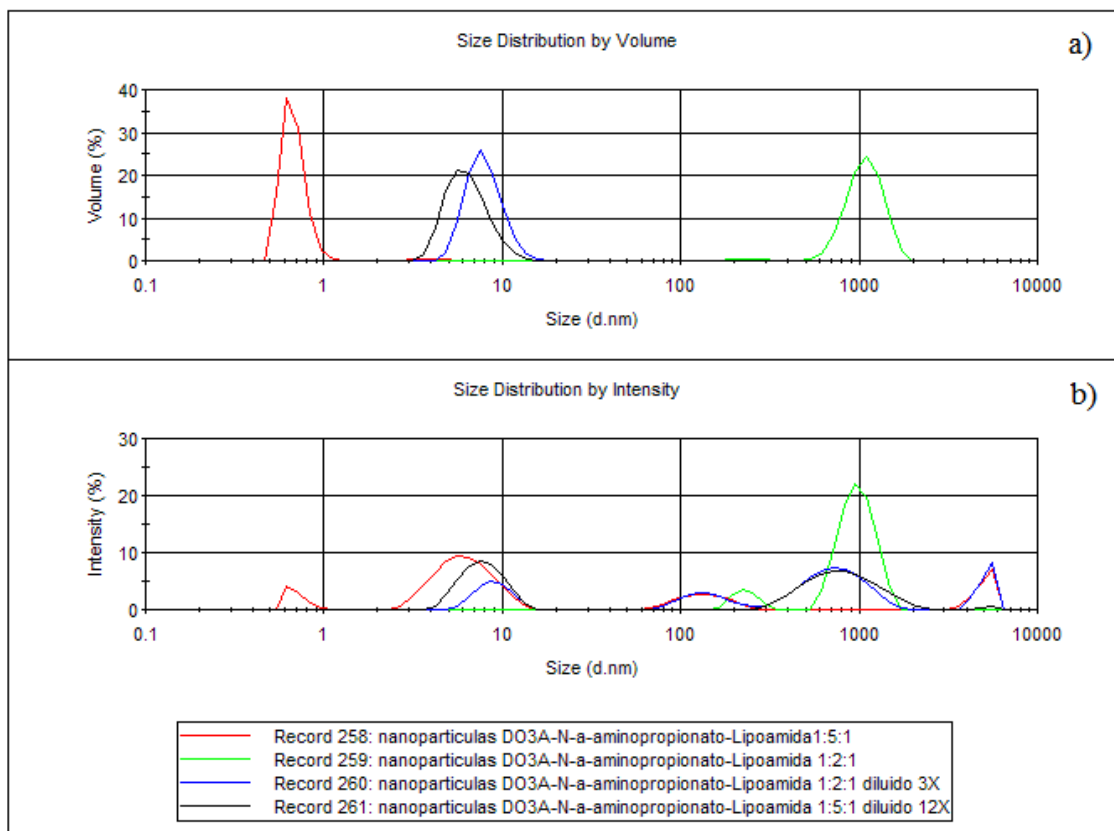


Figura 3.18- Curvas de distribuição (DLS) do diâmetro de nanopartículas de ouro funcionalizadas com DO<sub>3</sub>A-N- $\alpha$ -aminopropionato-Lipoamida, razão molar Au:Ligando 1:5:1, 1:2:1, em função do volume, **a)**, e da intensidade, **b)**.

Tabela 3.5- Valores de diâmetro obtidos a partir das curvas de distribuição das amostras de nanopartículas de ouro funcionalizadas com DO<sub>3</sub>A-N- $\alpha$ -aminopropionato-Lipoamida determinadas por DLS.

Amostra de DO <sub>3</sub> A-N- $\alpha$ -aminopropionato-Lipoamida	Z-Ave (d.nm)	Pdl	Diâmetro (nm) (%volume)	Diâmetro (nm) (%Intensidade)
Amostra 1:5:1	161	0,261	0,672 (98,3%)	5030 (14%)
			4,45 (1,7%)	138 (15,8%)
				6,35 (61,6%)
Amostra 1:2:1	1680	0,782	1090 (98,2%)	988 (89,6%)
			238 (1,8%)	231 (10,4%)
				760 (51%)
Amostra 1:2:1 (diluída 3x)	478	0,71	970 (0,4%)	143 (14,9%)
			8,02 (99,4%)	9,02 (19,5%)
Amostra 1:2:1 (diluída 12 x)	113	0,514	6,50 (99,9%)	866 (56%)
				7,91 (42,9)

Os resultados de UV-Vis e DLS são concordantes. Nanopartículas com tamanhos inferiores a 2 nm não apresentam *bandas plasmônicas* do ouro. [25,26] Na amostra com razão molar 1:2:1 concentrada verifica-se agregação das nanopartículas, as quais mostram tendência para se depositarem no fundo do frasco de amostra. Os resultados

de DLS revelam que a amostra concentrada apresenta nanopartículas de 238 e 1090 nm em função do volume. A diluição da amostra por um factor 3 faz diminuir o tamanho das nanopartículas para 8 nm, e quando se efectua uma diluição de 12 vezes a amostra apresenta um tamanho de aproximadamente 6,5 nm.

Um factor que complica muito a análise e purificação das nanopartículas é o carácter micelar dos ligandos. Nas condições usadas para a preparação das nanopartículas é provável que o ligando esteja acima do seu *cmc*.

### **3.3.7 Estudos de complexação de nanopartículas de ouro funcionalizadas com o ligando DOTA-Lipoamida**

A purificação das nanopartículas tem como objectivo remover sais de boro formados no processo de redução e ligando em excesso da solução de nanopartículas. A purificação foi tentada por duas técnicas diferentes, cromatografia de exclusão em Sephadex G25 e filtração centrífuga usando *Centricons* (Centrifugal Filter Devices, Amicon Ultra – 4, Ultracel – 10K) com Molecular Weight Cutoff de 10 000 Da. Na filtração centrífuga as nanopartículas foram lavadas várias vezes com água por centrifugação a 2830 g durante 15 minutos a 5° C. A concentração da solução de nanopartículas provoca alguma agregação irreversível das nanopartículas e adesão à membrana. Estudos de DLS de amostras purificadas por filtração centrífuga revelam que o tamanho das nanopartículas diminui um pouco após a centrifugação (Figura 3.19; 3.20; Tabela 3.6).

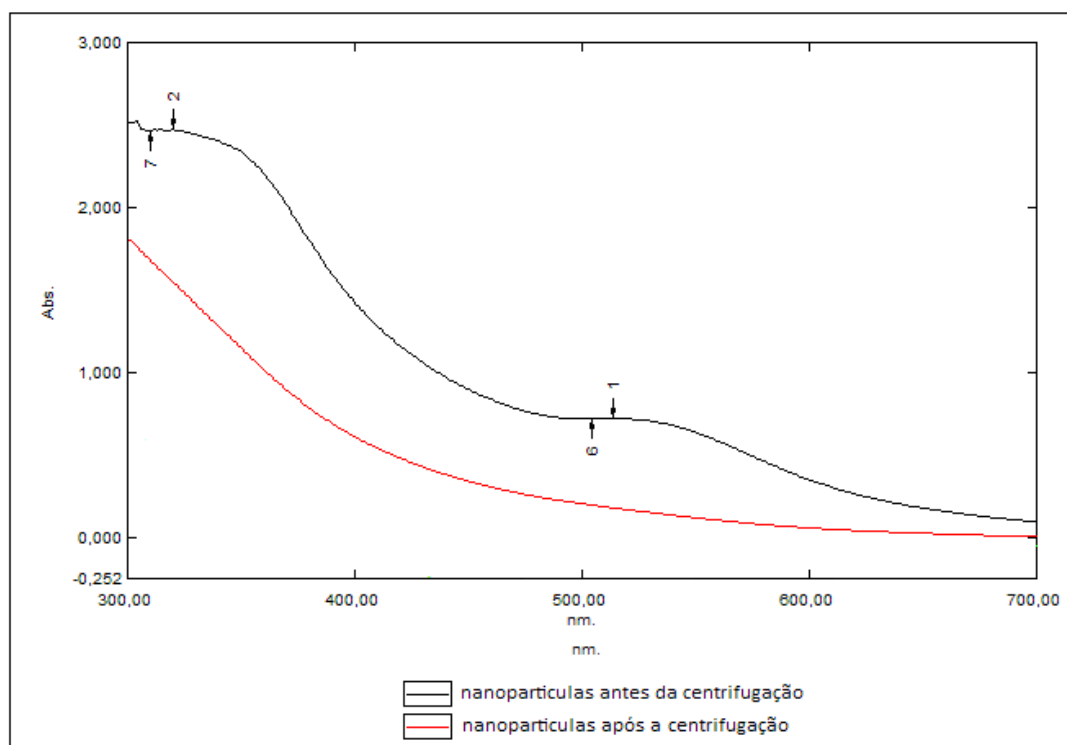


Figura 3.19- Espectros de UV-Vis de uma amostra de nanopartículas de ouro funcionalizadas com o ligando DOTA-Lipoamida, razão molar Au:Ligando 1:5, antes e após purificação por filtração centrífuga.

A diminuição da intensidade da *banda plasmônica do ouro* após lavagem das nanopartículas é concordante com a diminuição de tamanho observado por DLS (Figura 3.20).



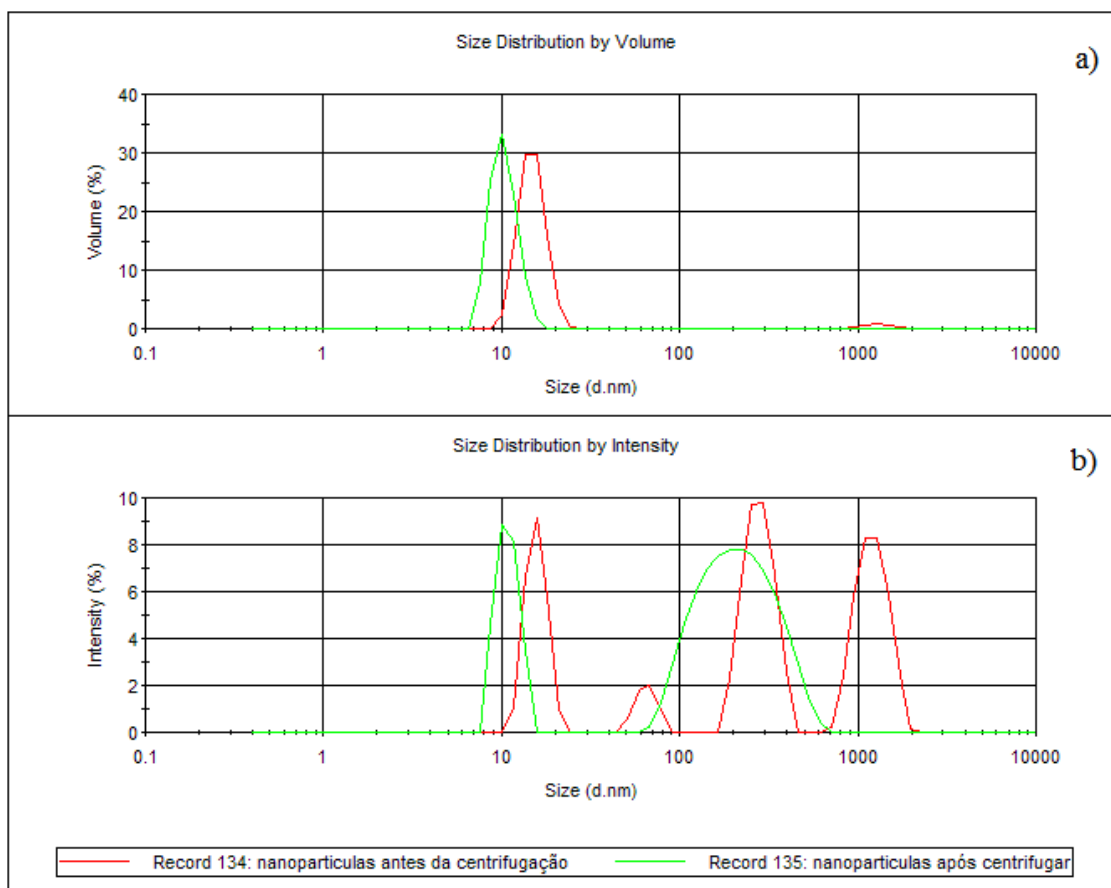


Figura 3.20- Curvas de distribuição do diâmetro (DLS) de nanopartículas de ouro funcionalizadas com o agente quelante DOTA-Lipoamida, razão molar Au:Ligando de 1:5, em função do volume, **a)**, e da intensidade, **b)**, antes e após purificação por FC.

Tabela 3.6- Valores de diâmetro obtidos a partir das curvas de distribuição (DLS) das amostras de nanopartículas de ouro funcionalizadas com DOTA-Lipoamida antes e após a centrifugação.

Amostra de DOTA-Lipoamida (1:5:1)	Z-Ave (d.nm)	Pdl	Diâmetro (nm) (%volume)	Diâmetro (nm) (%Intensidade)
Antes da centrifugação	225	0,813	1260 (3,0%) 15 (96,3%)	1210 (33,4%) 281 (37,6%) 15,2 (23,7%)
Após centrifugação	125	0,291	10,7 (99,7%)	230 (74,8%) 10.8 (25,2%)

Por DLS não foi detectada a presença de micelas do ligando DOTA-Lipoamida nas lavagens. Este facto pode resultar da concentração de ligando se encontrar abaixo do *cmc*.

Na purificação por cromatografia de exclusão molecular com CEM - Sephadex G25 ocorre uma ligeira diluição da solução de nanopartículas, não sendo aparente qualquer fenómeno de precipitação e/ou agregação. As nanopartículas são eluídas no

volume vazio da coluna. A amostra purificada apresenta uma *banda plasmônica do ouro* menos intensa, ainda que bem definida (Figura 3.21).

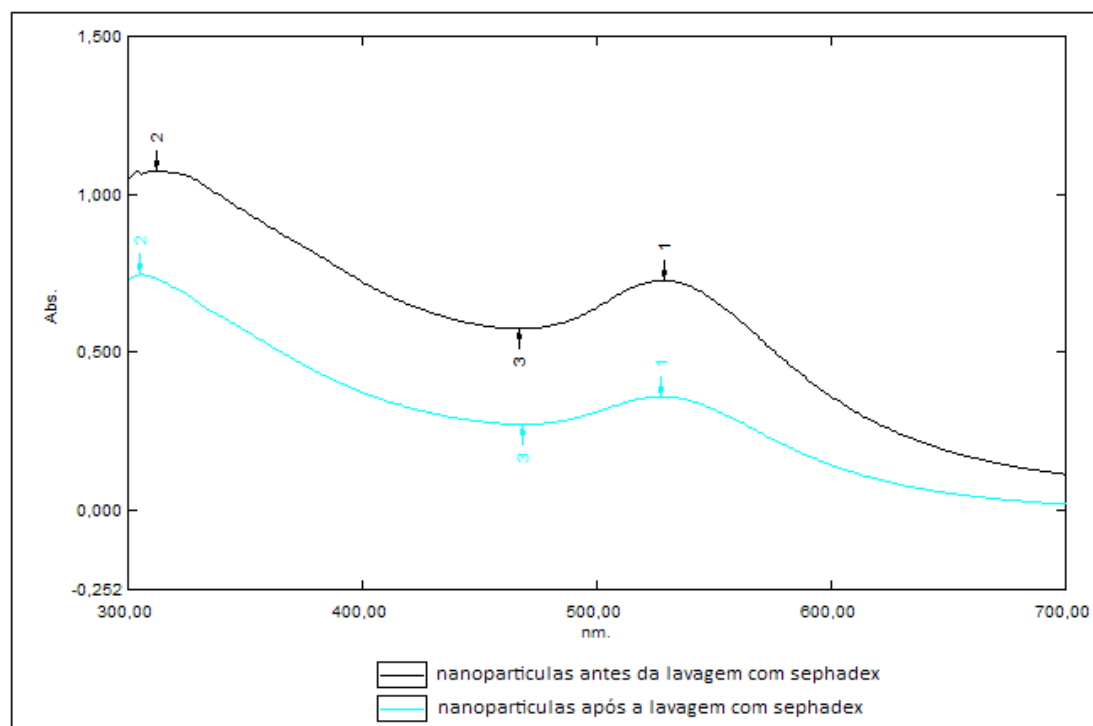


Figura 3.21- Espectro de UV-Vis para uma amostra de nanopartículas de ouro funcionalizadas com o ligando DOTA-Lipoamida antes e após passagem numa coluna de exclusão com Sephadex G25.

Por DLS é possível verificar que após a purificação por CEM as nanopartículas vão adquirir um tamanho inferior, 7,14 nm, ao apresentado antes da purificação 24,7 nm (Figura 3.22; Tabela 3.7).

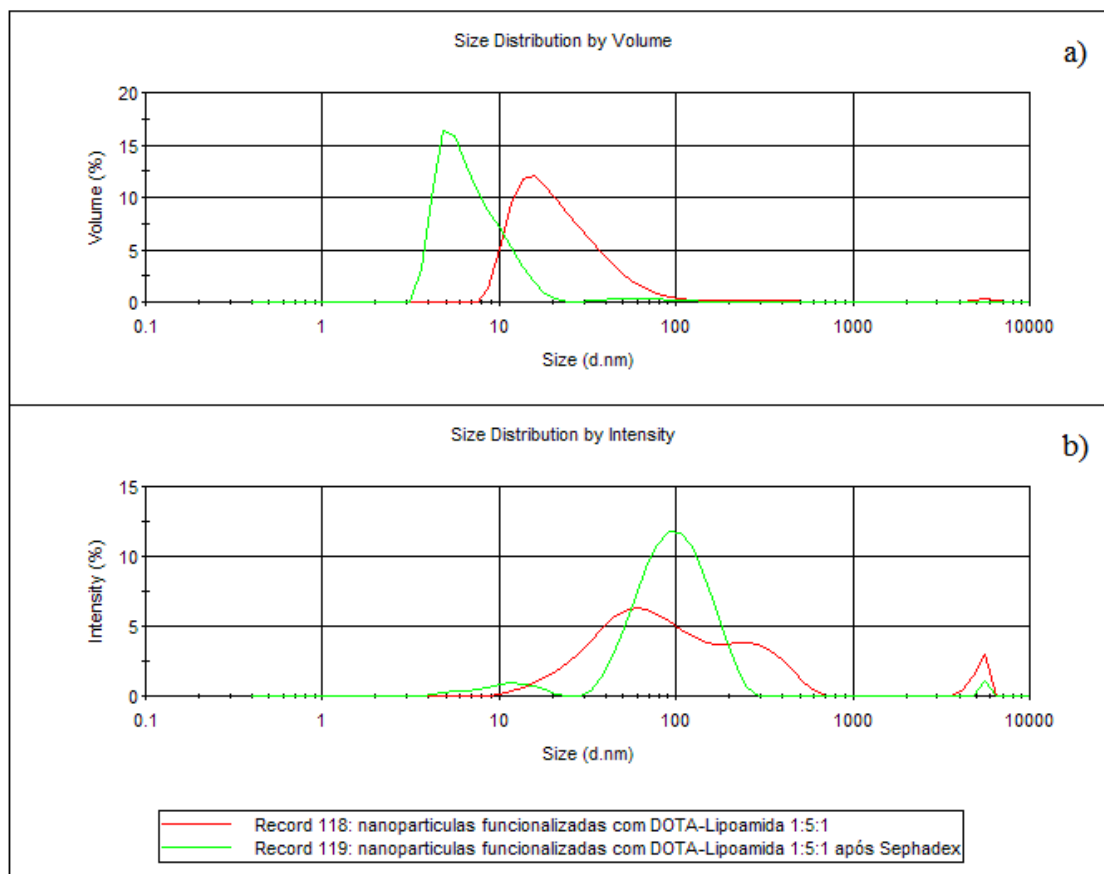


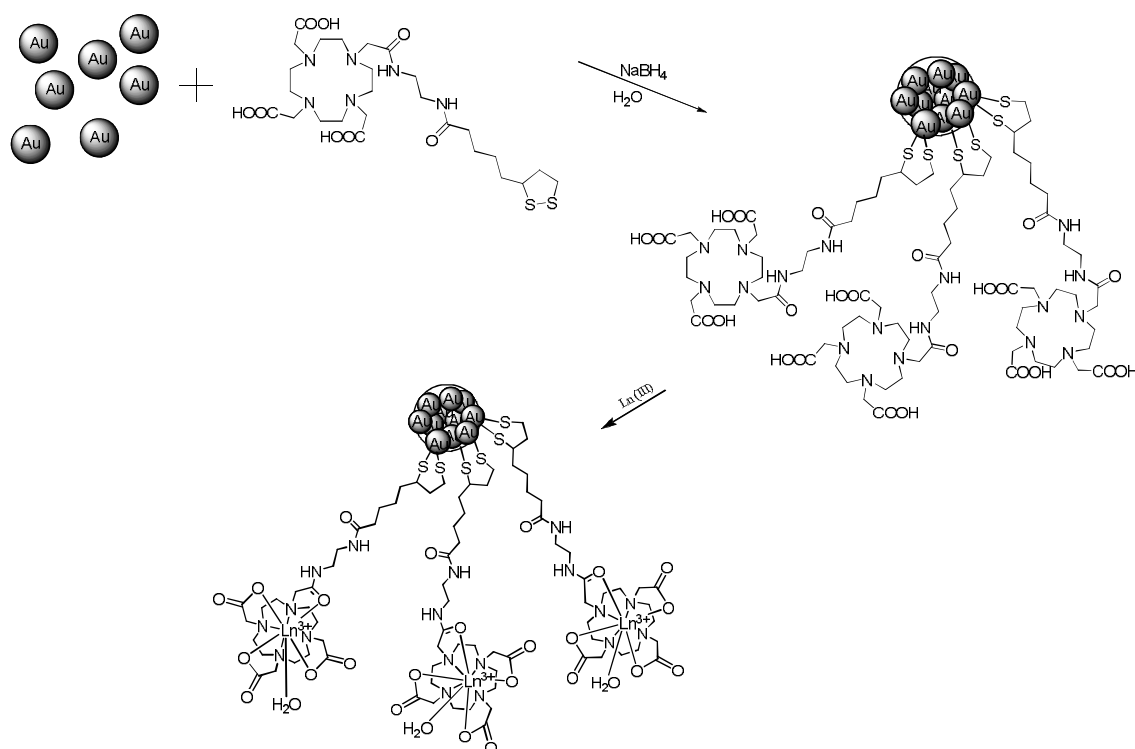
Figura 3.22- Curvas de distribuição do diâmetro (DLS) de nanopartículas de ouro funcionalizadas com o agente quelante DOTA-Lipoamida, razão molar Au:Ligando 1:5, em função volume, **a)**, e em função da intensidade, **b)**, antes e após purificação por cromatografia de exclusão molecular com Sephadex G25.

Tabela 3.7- Parâmetros obtidos a partir das curvas de distribuição (DLS) das amostras de nanopartículas de ouro funcionalizadas com DOTA-Lipoamida determinadas por DLS antes e após a centrifugação.

Au:DOTA-Lipoamida (1:5:1)	Z-Ave (d.nm)	Pdl	Diâmetro (nm) (%volume)	Diâmetro (nm) (%Intensidade)
Antes da CEM Sephadex	878	0,409	322 (1.0%)	5220 (4,6%)
			24,7 (98.4%)	285 (26,7%)
				70,6 (68,7%)
Após CEM	108	0,290	70,3 (2.6%)	105 (93%)
			7,14 (97.4%)	11,3 (5,9%)

Os estudos de DLS das nanopartículas purificadas, quer por FC quer por CEM, não são claros. Não conseguimos saber se depois da purificação continua a haver ligando livre, na forma de micelas, a coexistir com as nanopartículas em solução. Como, para prosseguir com os estudos de complexação, necessitamos de conhecer a quantidade de agente complexante ligado às nanopartículas após a purificação, optámos por realizar os estudos preliminares de complexação usando a preparação

impura de nanopartículas. A solução foi apenas filtrada através de um filtro com porosidade 0,2  $\mu\text{m}$ . Deste modo, podemos calcular a quantidade de metal a adicionar a partir da quantidade total de ligando usado na preparação das nanopartículas. Um passo final de purificação, por FC ou CEM permite obter uma preparação pura de nanopartículas *carregadas* com metal. Para determinar a quantidade de ligando que é possível complexar sem ocorrer agregação das nanopartículas efectuamos um estudo em que preparamos três amostras às quais foram adicionadas 1,0, 0,8 e 0,5 equivalentes de uma solução de  $\text{Gd}^{3+}$ . As soluções foram mantidas a pH 5,5, por adição de NaOH 0,1 M, durante a adição da solução de  $\text{Gd}^{3+}$ , sendo posteriormente colocadas sob agitação a 50  $^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas (Esquema 3.6).



Esquema 3.6- Estratégia geral para a preparação de nanopartículas funcionalizadas com quelatos de íons Lantanídeo(III).

Na amostra à qual foi adicionado 1 equivalente de  $\text{Gd}^{3+}$  verificou-se a precipitação completa das nanopartículas. A amostra que tinha sido complexada com 0,8 equivalentes de ligando apresentava bastantes indícios de agregação, verificando-se um depósito no fundo do frasco de amostra. O sobrenadante apresentava uma coloração muito menos intensa do que a amostra inicial. A amostra complexada com

0,5 equivalentes de európio, não apresentava qualquer precipitado, não existindo indícios de agregação na solução.

Não se verificou uma alteração muito significativa do tamanho das nanopartículas após a complexação com 0,5 eq. de  $Gd^{3+}$  (Figura 3.23; Tabela 3.8).

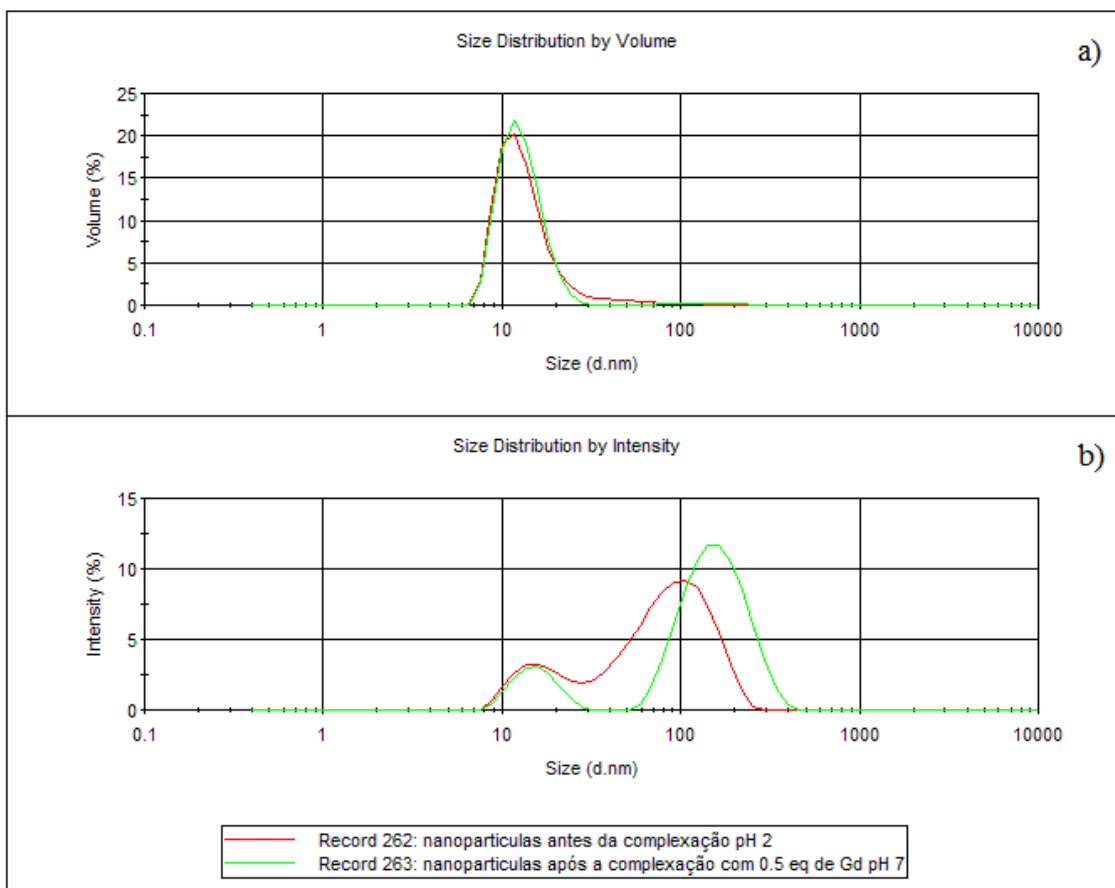


Figura 3.23- Curvas de distribuição do diâmetro (DLS) de nanopartículas de ouro funcionalizadas com DOTA-Lipoamida em função do volume, **a)**, e em função da intensidade, **b)**, para uma solução de nanopartículas de ouro funcionalizadas com DOTA-Lipoamida, antes e após a adição de 0.5 eq de  $Gd^{3+}$ .

Tabela 3.8- Valores de diâmetro obtidos a partir das curvas de distribuição das amostras de nanopartículas de ouro funcionalizadas com DOTA-Lipoamida determinadas por DLS antes e após a complexação com  $Gd^{3+}$ .

Amostra de DOTA-Lipoamida (1:5:1)	Z-Ave (d.nm)	Pdl	Diâmetro (nm) (%volume)	Diâmetro (nm) (%Intensidade)
Antes da complexação	105	0,250	15,0 (100%)	97,1(79,6%) 17,2 (20,4%)
Após complexação com 0.5 eq. $Gd^{3+}$	80,1	0,580	142 (1,5%) 13,0 (98,5%)	164 (84,6%) 15,6 (15,4%)

Medições de Potencial Zeta (Figura 3.24) para a amostra antes da complexação, a pH 2,3, fornecem um valor de potencial zeta positivo (+20,4 mV), indicando que a este valor de pH os grupos ácido carboxílico e os grupos amina do esqueleto do DOTA estão protonados, pelo que as nanopartículas têm carga global positiva. A pH 6,0 o valor de potencial Zeta é negativo, indicando que as nanopartículas têm carga global negativa. Após a complexação é possível observar a diminuição do valor de Potencial Zeta (-29,6 mV), para valores mais próximos de 0 (-19,7 mV). Estes resultados sugerem que apenas uma fracção do agente quelante ligado às nanopartículas é passível de complexação sem induzir agregação e precipitação das nanopartículas. A complexação completa do agente quelante na superfície das nanopartículas levaria à anulação do potencial Zeta, uma vez que a carga global do complexo Gd(DOTA-Lipoamida) é nula, induzindo a agregação das nanopartículas. Deboutière et al. também reportou este efeito com nanopartículas funcionalizadas com agentes quelantes do tipo DTPA-bisamida, os quais também formam quelatos de  $Gd^{3+}$  com carga global nula.

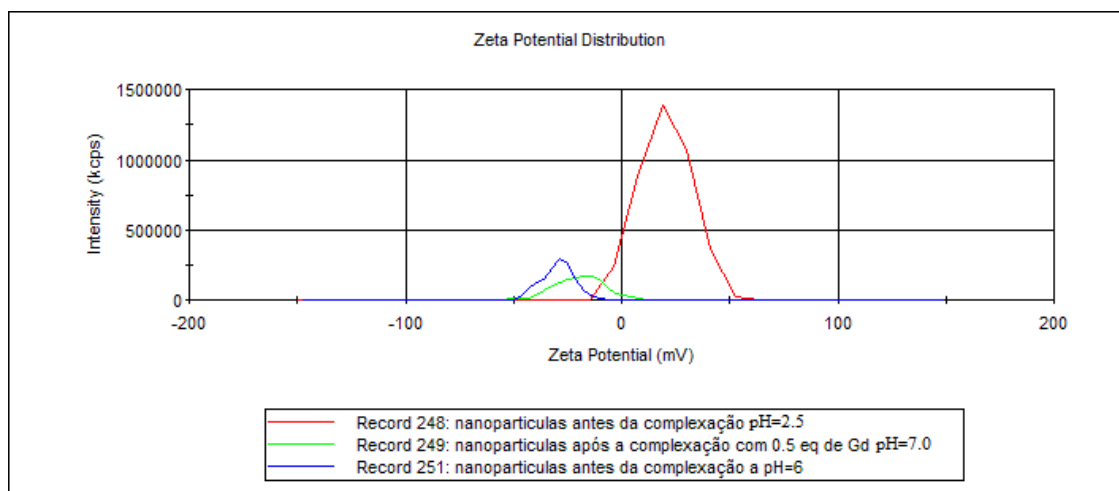


Figura 3.24- Gráfico de Potencial Zeta para soluções de nanopartículas de ouro funcionalizadas com DOTA-Lipoamida: a pH 2 e 6 antes da adição de  $Gd^{3+}$  e a pH 7 após a adição de 0,5 eq. de  $Gd^{3+}$ .

Mais recentemente, a complexação das nanopartículas, foi realizada em tampão acetato 0,4 M, pH 5,1. Adição de 1,0 equivalente de  $Eu^{3+}$  não induziu precipitação das nanopartículas após agitação a 50 °C durante 24 horas. Estes resultados preliminares são promissores e necessitam de investigação posterior.

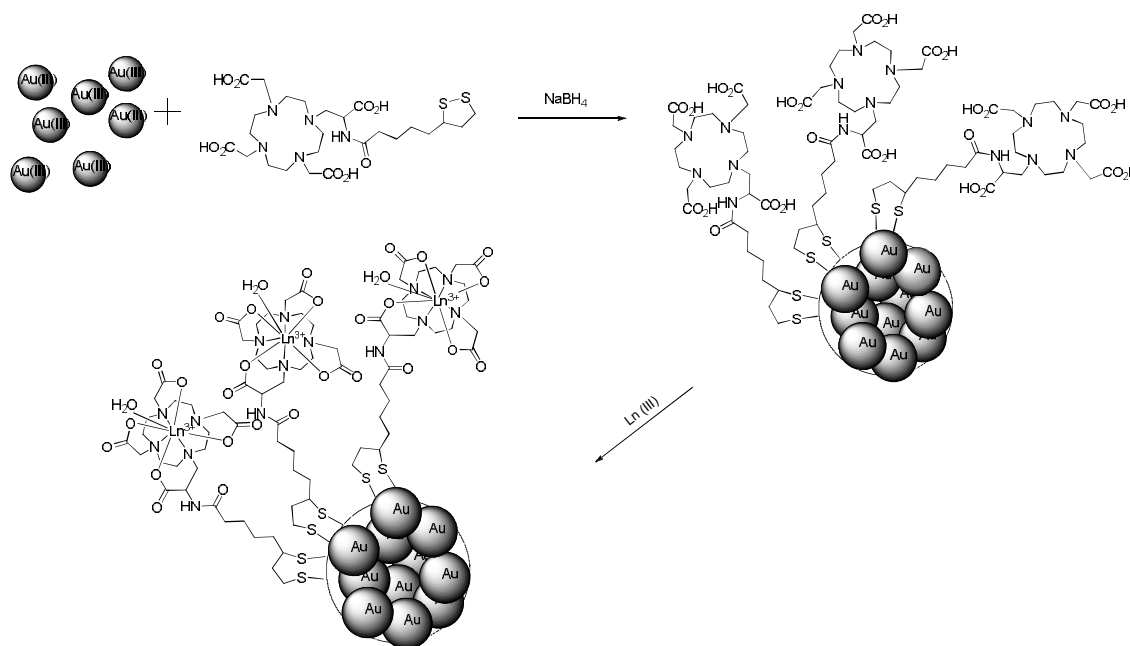
### 3.3.8 Estudos de complexação de nanopartículas funcionalizadas com o ligando DO<sub>3</sub>A-*N*- $\alpha$ -aminopropionato-Lipoamida

A amostra de nanopartículas funcionalizadas com o ligando DO<sub>3</sub>A-*N*- $\alpha$ -aminopropionato-Lipoamida foi preparada de acordo com a tabela 3.9:

Tabela 3.9- Condições usadas para a preparação de nanopartículas de ouro funcionalizadas com o agente quelante DO<sub>3</sub>A-*N*- $\alpha$ -aminopropionato-Lipoamida.

Amostra	Volume de [HAuCl <sub>4</sub> ] <sub>(aq)</sub> · (7,3 $\mu$ mol/cm <sup>3</sup> )	Volume de [DO <sub>3</sub> A- <i>N</i> - $\alpha$ -aminopropionato-Lipoamida] <sub>(aq)</sub> · (7,3 $\mu$ mol/cm <sup>3</sup> )	Volume de NaBH <sub>4</sub> <sub>(aq)</sub> · (70,0 $\mu$ mol/cm <sup>3</sup> )	Concentração final do ligando ( $\mu$ mol/cm <sup>3</sup> )
1:2:1	1 cm <sup>3</sup>	2,0 cm <sup>3</sup>	0,056 cm <sup>3</sup>	4,87

Neste estudo acompanhamos as partículas desde a sua síntese para que se possam tirar elações dos resultados obtidos. A estratégia seguida para a preparação de nanopartículas de ouro funcionalizadas com quelatos de Gd<sup>3+</sup> está representada no Esquema 3.7.



Esquema 3.7- Estratégia geral para a síntese de nanopartículas funcionalizadas com quelatos de Gd(DO<sub>3</sub>A-*N*- $\alpha$ -aminopropionato-Lipoamida).

As nanopartículas de ouro foram sintetizadas pelo método de *Brust* e deixadas sob agitação à temperatura ambiente durante 24 horas e a 50 °C durante 48 horas. A

mostra foi diluída com volume igual de tampão acetato (0,4 M, pH 5,1), foi complexada com um equivalente de íon  $\text{Eu}^{3+}$  e colocada novamente a agitar a 50 °C durante 24 horas. Este processo foi acompanhado por estudos de UV-Vis (Figura 3.25).

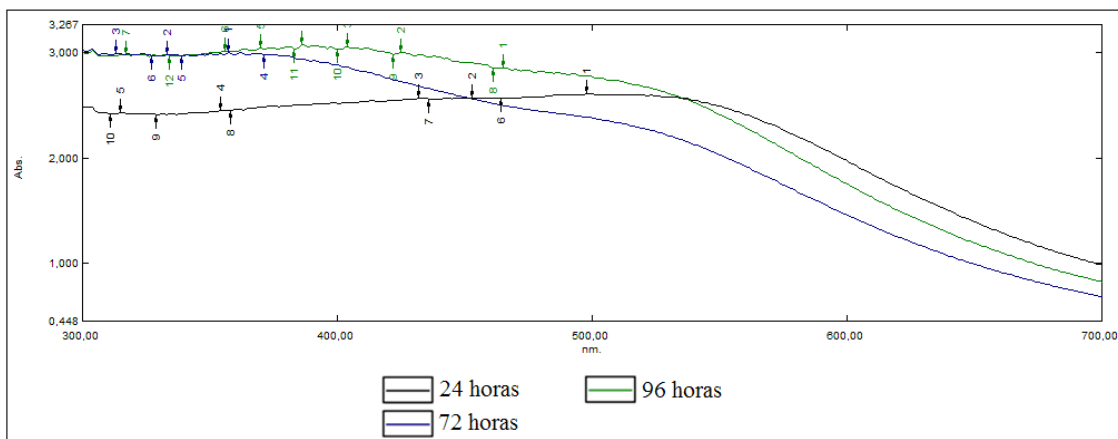


Figura 3.25- Espectro de UV-Vis das nanopartículas de ouro funcionalizadas com  $\text{DO}_3\text{A-N-}\alpha$ -aminopropionato-Lipoamida, após 24 horas sob agitação à temperatura ambiente, após 48 horas sob agitação a 50 °C e após 24 horas sob agitação a 50 °C depois da adição de  $\text{Eu}^{3+}$ .

Pela análise dos espectros de UV-Vis (Figura 3.25) podemos verificar que para as partículas complexadas com  $\text{Eu}^{3+}$  a *banda de plasmônica* sofre um aumento de intensidade apesar do efeito de diluição resultante da adição da solução de  $\text{Eu}^{3+}$ . A adição do metal não provoca uma alteração muito significativa no tamanho das nanopartículas (Figura 3.26; Tabela 3.10).

Antes da complexação as nanopartículas apresentam um tamanho de 8 nm e após a complexação apresentam um tamanho de aproximadamente 7 nm.



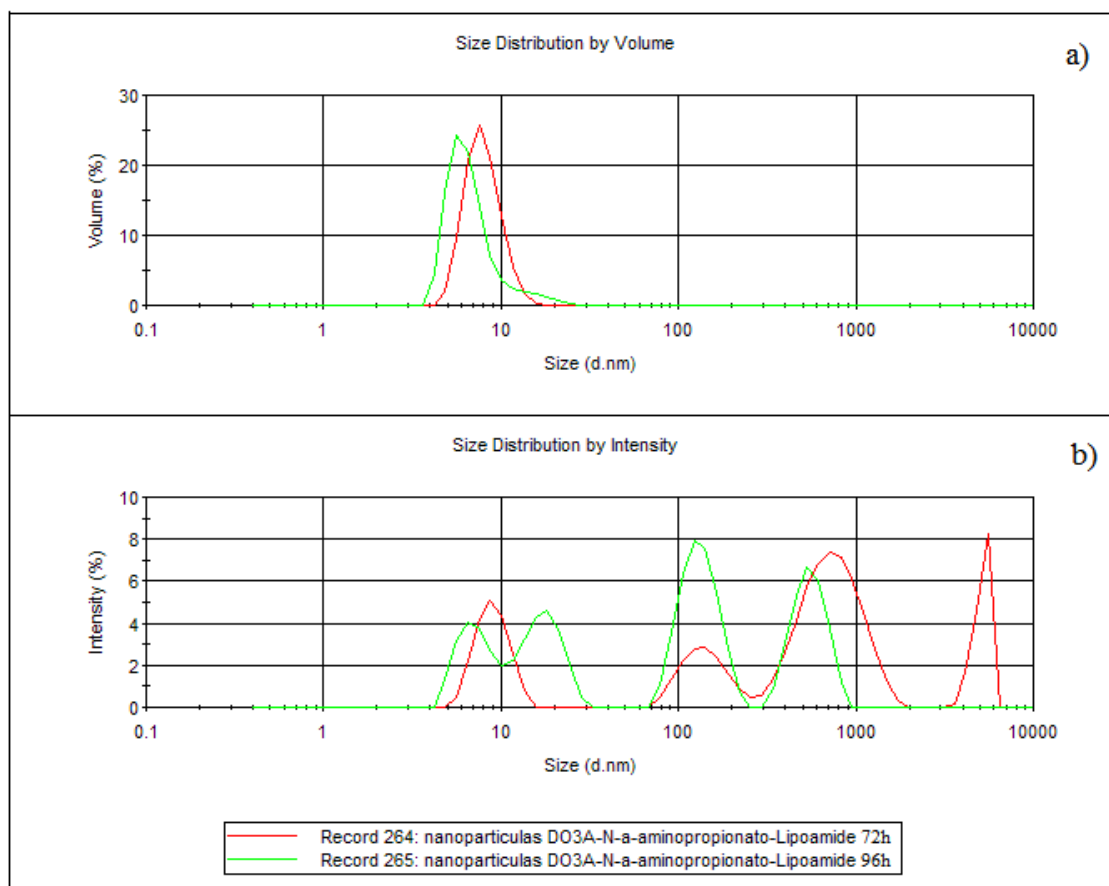


Figura 3.26- Gráfico de distribuição dos tamanhos das nanopartículas de ouro funcionalizadas com DO<sub>3</sub>A-N-α-aminopropionato-Lipoamida 72 horas (24 horas à temperatura ambiente e 48 horas sob agitação a 50 °C) e às 96 horas (24 horas à temperatura ambiente, 48 horas sob agitação a 50 °C e 24 horas sob agitação a 50 °C após a complexação com Eu<sup>3+</sup>) em função do volume, **a)**, e em função da intensidade, **b)**

Tabela 3.10- Valores de diâmetro obtidos a partir das curvas de distribuição das amostras de nanopartículas de ouro funcionalizadas com DO<sub>3</sub>A-N-α-aminopropionato-Lipoamida determinadas por DLS antes e após a complexação com Gd<sup>3+</sup>.

Amostra de DO <sub>3</sub> A-N-α-aminopropionato-Lipoamida(1:2:1)	Z-Ave (d.nm)	PdI	Diâmetro (nm) (%volume)	Diâmetro (nm) (%Intensidade)
Antes da complexação	478	0,710	8,02 (99,4%)	760 (51,0%)
				143 (14,9%)
				9,02 (19,5%)
Após complexação	152	0,304	7,07 (99,9%)	552 (26,3%)
				133 (34,8%)
				17,7 (22,2%)

Para estas amostras, foi possível confirmar, através do teste do alaranjado de Xilenol, que não existia európio livre em solução.

A espectroscopia de UV-Vis, os estudos de DLS, as medições de Potencial ZETA e o teste do alaranjado de xilenol indicam que ocorre complexação de metal pelas nanopartículas funcionalizadas com os agentes quelantes DOTA-Lipoamida e DO<sub>3</sub>A-N-

$\alpha$ -aminopropionato-Lipoamida. Estes resultados necessitam de confirmação através de estudos de ICP, os quais permitirão também quantificar a razão Au : Gd<sup>3+</sup> nas nanopartículas.

### 3.3.9 Biodistribuição de nanopartículas funcionalizadas com DO<sub>3</sub>A-N- $\alpha$ -aminopropionato-Lipoamida e marcadas com <sup>153</sup>Sm<sup>3+</sup>

As experiências de biodistribuição foram realizadas no IBILI, Coimbra pela Doutora Isabel Prata .

Os resultados da biodistribuição das nanopartículas de ouro funcionalizadas com DO<sub>3</sub>A-N- $\alpha$ -aminopropionato-Lipoamida e marcadas com <sup>153</sup>Sm<sup>3+</sup> foram obtidos 2 horas e a 24 horas após injeção (Figura 3.27).

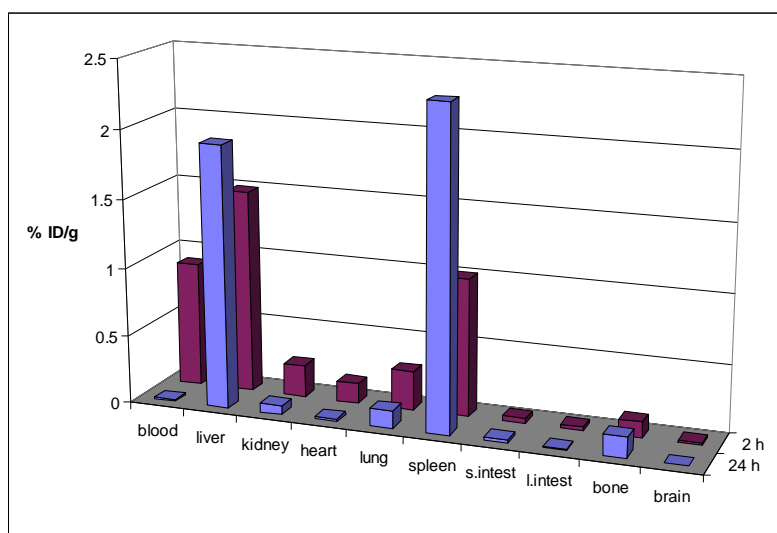


Figura 3.27- Biodistribuição das nanopartículas de ouro funcionalizadas com [<sup>153</sup>Sm(DO<sub>3</sub>A-N- $\alpha$ -aminopropionato-Lipoamida)], apresentada como percentagem de dose injectada por grama de órgão (%ID/g), em ratos Wistar: a) 2 h e b) 24 h após injeção. Os resultados são obtidos de um universo de 4 animais para cada experiência.

Ao fim de 2 horas as nanopartículas encontram-se principalmente nos órgãos do sistema reticuloendotelial (RES), fígado e baço, e em menor extensão no sangue. Ao fim de 24 horas após a injeção apenas se encontra actividade significativa nos órgãos do sistema reticuloendotelial, RES [27]. A actividade no baço duplica aproximadamente, enquanto que a actividade no fígado aumenta apenas ligeiramente. A actividade nos ossos é pouco significativa excluindo a possibilidade de que possa ter ocorrido desmetalção do complexo e formação de colóides insolúveis. A análise da

actividade no sangue ao fim 30 e 60 minutos, 2 e 24 horas revela que ao fim de 24 horas (Figura 3.28) já não existe actividade substancial no sangue. Contudo, a diminuição da actividade no sangue é relativamente rápida, verificando-se uma diminuição de aproximadamente 50% entre os 30 minutos e as duas horas.

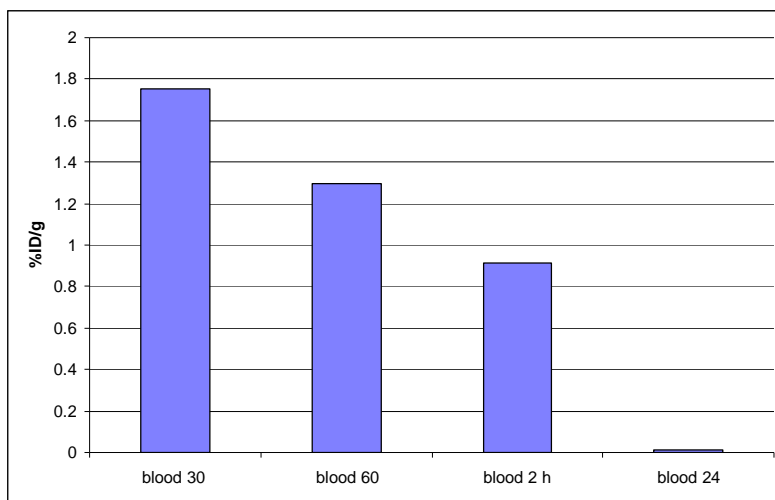


Figura 3.28- Actividade no sangue em animais injectados com nanopartículas de ouro funcionalizadas com o agente quelante  $\text{DO}_3\text{A-N-}\alpha\text{-aminopropionato-Lipoamida}$  e marcadas com  $^{153}\text{Sm}^{3+}$ . Cada ponto representa a média dos 4 animais

A retenção de uma actividade tão alta no baço e no fígado ao fim de 24 horas sugere que as nanopartículas foram internalizadas e retidas pelas células.

### 3.4 Conclusão

Neste estudo foram sintetizados e caracterizados dois novos agentes quelantes funcionalizados com ácido lipóico: DOTA-Lipoamida e DO<sub>3</sub>A-*N*- $\alpha$ -aminopropionato-Lipoamida. A síntese do ligando DOTA-Lipoamida foi realizada usando um quelato bifuncional previamente descrito pelo nosso grupo de investigação. Em solução acídica o ligando DOTA-Lipoamida polimeriza lentamente através do fragmento ácido lipóico. Contudo o ligando (na forma hidrocloreto) é estável. A síntese do ligando DO<sub>3</sub>A-*N*- $\alpha$ -aminopropionato-Lipoamida foi realizada usando uma via sintética nova desenvolvida neste trabalho. O rendimento obtido na síntese deste ligando foi baixo devido à tendência do fragmento ácido lipóico para polimerizar em condições acídicas e às dificuldades encontradas no processo de purificação. Usando um derivado de cisteína no acoplamento conseguimos obter o conjugado desejado **26** ainda que contaminado com DO<sub>3</sub>A. É necessário um estudo detalhado para otimizar esta via sintética, a qual é muito promissora para a síntese de conjugados do *sintão* DO<sub>3</sub>A-*N*- $\alpha$ -aminopropionato.

Determinou-se por relaxometria o *cmc* do complexo Gd(DOTA-Lipoamida) tendo-se obtido um valor mais baixo do que era esperado, da mesma ordem de grandeza que o reportado para o complexo Gd(EPTPA-C16), tendo em conta o tamanho da sua cadeia hidrocarbonada.

Neste estudo, desenvolvemos com sucesso metodologias sintéticas para preparar nanopartículas de ouro funcionalizadas com os agentes quelantes DOTA-Lipoamida e DO<sub>3</sub>A-*N*- $\alpha$ -aminopropionato-Lipoamida. O método de substituição de citrato pelo complexo Gd(DOTA-Lipoamida) em nanopartículas (pré-formadas) estabilizadas com citrato, produziu resultados ambíguos. Por outro lado, o método de *Brust* revelou-se apropriado para a preparação de nanopartículas funcionalizadas com ambos os agentes quelantes, DOTA-Lipoamida e DO<sub>3</sub>A-*N*- $\alpha$ -aminopropionato-Lipoamida. A razão molar Au/ligando emergiu como o principal factor afectando o tamanho das nanopartículas. A formação das nanopartículas foi estudada por espectroscopia de UV-Vis e DLS. As nanopartículas de ouro funcionalizadas com o agente quelante DOTA-Lipoamida apresentavam uma coloração avermelhada, semelhante à das nanopartículas estabilizadas com citrato, característica de nanopartículas de ouro com um tamanho entre os 14 e os 17 nm. As nanopartículas de

ouro funcionalizadas com o agente quelante DO<sub>3</sub>A-*N*- $\alpha$ -aminopropionato-Lipoamida apresentavam uma coloração acastanhada e tamanhos que variavam entre os 6 e os 8 nm e *bandas plasmónicas do ouro* em UV-Vis pouco intensas e mal definidas, características de nanopartículas com este tamanho. Foram testados dois métodos para purificar as nanopartículas: lavagem com água, através de filtração centrífuga, e cromatografia de exclusão molecular. Não nos foi possível avaliar a pureza das preparações de nanopartículas dado o carácter micelar dos ligandos usados.

Os estudos de complexação das nanopartículas funcionalizadas com o agente quelante DOTA-Lipoamida em água, sugerem que a complexação total origina agregação e precipitação das nanopartículas devido à anulação do potencial zeta das nanopartículas, como consequência da formação de complexos neutros.

Experiências preliminares de complexação das nanopartículas funcionalizadas com o agente quelante DO<sub>3</sub>A-*N*- $\alpha$ -aminopropionato-Lipoamida, indicam que a complexação pode ser realizada em tampão acetato usando mesmo um excesso de metal relativamente à quantidade de ligando usado na síntese. O complexo Gd(DO<sub>3</sub>A-*N*- $\alpha$ -aminopropionato-Lipoamida) tem carga global -1, ficando as nanopartículas com um potencial zeta negativo, o que poderá impedir a agregação e precipitação das nanopartículas.

Os estudos de biodistribuição das nanopartículas de ouro funcionalizadas com o agente quelante DO<sub>3</sub>A-*N*- $\alpha$ -aminopropionato-Lipoamida marcadas com <sup>153</sup>Sm<sup>3+</sup> indicam que as nanopartículas são internalizadas e retidas pelos macrófagos residentes no baço e fígado.

Os resultados preliminares deste projecto são bastante promissores relativamente ao uso do agente quelante DO<sub>3</sub>A-*N*- $\alpha$ -aminopropionato-Lipoamida para a preparação de nanopartículas de ouro funcionalizadas com quelatos de Gd<sup>3+</sup> para uso como agentes de contraste em IRM.

### 3.5 Secção experimental

#### 3.5.1 Materiais e equipamentos

Os produtos químicos foram adquiridos à Sigma-Aldrich e utilizados sem qualquer purificação adicional. O cicleno foi adquirido à chematech e utilizado sem nenhuma purificação adicional. Foram usados solventes de maior grau de pureza disponível (p.a.), os quais foram purificados pelos métodos usuais. As reacções foram monitorizadas por TLC Kieselgel 60 F254 (Merck) em suporte de alumínio. Os processos de revelação utilizados foram a observação sob luz UV (254 nm), a adsorção de vapor de iodo e através de emersão em uma solução de ninidrina ( $\approx 1\%$ ) seguida de aquecimento. A cromatografia de flash foi feita em Kieselgel 60 (Merck, 230-400). A cromatografia de troca iónica foi efectuada em resina Dowex 1X2-OH<sup>-</sup>, adquirida à Sigma-Aldrich. A resina foi adquirida sob a forma de Cl<sup>-</sup> e convertida a resina OH<sup>-</sup> por um método standard. As fracções relevantes resultantes da cromatografia de flash foram concentradas a pressão reduzida,  $T < 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ . O H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> foi cedido pelo grupo do Prof Doutor Carlos Jorge Silva, que o tinha sido adquirido à Sigma Aldrich e que foi usado sem qualquer purificação. Os espectros de RMN de <sup>1</sup>H (1D e 2D) e de <sup>13</sup>C foram obtidos num espectómetro Varian Unity Plus 300 RMN, operando a 299,938 MHz e 75,428 MHz para <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C respectivamente. Os desvios químicos ( $\delta$ ) são dados em ppm relativamente ao solvente CDCl<sub>3</sub> (<sup>1</sup>H,  $\delta$  7,27; <sup>13</sup>C  $\delta$  77,36) como referência interna. Para espectros de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C em D<sub>2</sub>O os desvios químicos ( $\delta$ ) são dados em ppm, em relação a TSP como referência interna (<sup>1</sup>H,  $\delta$  0,0) e *tert*-butanol como referência externa (<sup>13</sup>C,  $\delta$  30,29). A espectroscopia de massa foi efectuada no CACTI - Vigo, Espanha. O cloreto de <sup>153</sup>Samarium (<sup>153</sup>SmCl<sub>3</sub>) foi produzido pelo ITN (Instituto Tecnológico e Nuclear), em Lisboa, com actividade específica  $>5\text{ GBq/mg}$ . As determinações de cmc foram efectuadas num relaxómetro Bruker Minispec mq20 (20 MHz, B<sub>0</sub>= 0,47 T, T= 25 °C), as determinações de DLS foram efectuadas num ZETA NANOSIZER MALVERN (T= 25 °C) e as determinações de UV-Vis foram efectuadas num Shimadzu UV2501PC (T= 25 °C).

### 3.5.2 Procedimentos experimentais

**Síntese do *tert*-butil2,2',2''-(10-(2-((5-(1,2-ditiolan-3-il)pentanamido)metilamino)-2-oxoetil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecane-1,4,7-triil)triacetato (20):** dissolveu-se o composto (18) (396 mg, 644  $\mu\text{mol}$ ) em diclorometano (20  $\text{cm}^3$ ). Adicionou-se aproximadamente 1,1 equivalentes de Diciclohexilcarbodiimida (159 mg, 730  $\mu\text{mol}$ ), hidroxibenzotriazol (214 mg, 730  $\mu\text{mol}$ ) e de ácido lipoíco (19) (288 mg, 730  $\mu\text{mol}$ ). Deixou-se a reacção sob agitação durante a noite. Concentrou-se a amostra sob pressão reduzida. Dissolveu-se em acetato de etilo, lavou-se com  $\text{KHCO}_3$ , brime e ácido cítrico. Concentrou-se a amostra sob pressão reduzida de modo a obter-se o composto pretendido (11). O resíduo foi purificado através de uma cromatografia Dry Flash (100%  $\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow \text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$  (1:1)) para se obter o composto 20 purificado (311 mg, 61%). RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$ = 1,43 (s, 27H, *t*-Bu), 1,65 (m, 4H, 2 X  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 1,89 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CHCH}_2$ ), 2,35 (t,  $J$ = 7,65 Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 2,43 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 2,10-3,40 (observamos um conjunto de sinais largos que integram para 16 H,  $\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{N}$  e 8H  $\text{CH}_2\text{C}(\text{O})$ ), 3,01 (m, 6H,  $\text{CH}_2\text{CHCH}_2$  e  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 3,54 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{CHCH}_2$ ).

**Síntese do DOTA-Lipoamida (14):** Dissolveu-se o composto (20) (170 mg, 215  $\mu\text{mol}$ ) em 20  $\text{cm}^3$  de uma solução de HCl 3 M, composta por 5  $\text{cm}^3$  de água, 10  $\text{cm}^3$  de etanol e de 5  $\text{cm}^3$  de HCl concentrado. Deixou-se a agitar à temperatura ambiente durante a noite. Evaporou-se a solução e lavando com água. O sólido foi liofilizado para remover a água obtendo-se o composto pretendido (14) (125 mg, 94%). RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$ = 1,45 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 1,54 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 1,71 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 1,97 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 2,23 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 2,47 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 2,10-3,40 (observamos um conjunto de sinais largos que integram para 16 H,  $\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{N}$  e 8H  $\text{CH}_2\text{C}(\text{O})$ ), 3,68 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{CHCH}_2$ ). RMN de  $^{13}\text{C}$  (75,4 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ): 25,213 (1C,  $\text{CH}_2$ ), 25,67 (1C,  $\text{CH}_2$ ), 28,10 (1C,  $\text{CH}_2$ ), 33,88 (1C,  $\text{CH}_2$ ), 35,75 (1C,  $\text{CH}_2$ ), 38,28 (1C,  $\text{CH}_2$ ), 38,44 (1C,  $\text{CH}_2$ ), 38,72 (1C,  $\text{CH}_2$ ), 39,14 (1C,  $\text{CH}_2$ ), 40,52 (1C,  $\text{CH}_2$ ), 53,47 (2C,  $\text{CH}_2$ ), 55,08 (2C,  $\text{CH}_2$ ), 56,78 (1C,  $\text{CHCH}_2$ ), 110,00 (2C,  $\text{C}(\text{O})$ ), 177,39 (3C,  $\text{C}(\text{O})$ ).

**Síntese do trietil 2,2',2''-(10-(2-(bis(tert-butoxicarbonil)amino)-3-metoxi-3-oxopropil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triil)triacetato (21):** Adicionou-se  $K_2CO_3$  (2,79 g, 20,2 mmol) a uma solução do metil2-(bis(tert-butoxicarbonil)amino)-3-(1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1-il)propanoato (**3**) (1,59 g, 3,36 mmol), em MeCN (40 cm<sup>3</sup>). Adicionou-se à suspensão uma solução de bromoacetato de etilo (1,5 cm<sup>3</sup>, 13,4 mmol) e manteve-se sob agitação à temperatura ambiente durante 3h. O sólido em suspensão foi removida por filtração e a solução foi concentrada a pressão reduzida. Purificação por cromatografia flash (100%  $CH_2Cl_2 \rightarrow CH_2Cl_2/EtOH$  (1:1)) forneceu o composto pretendido **21** (1,74 g, 71%) na forma de uma espuma branca. RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$ = 1,26 (m, 9 H,  $OCH_3$ ), 1,46 (conjunto de singuletos,  $C(CH_3)_3$ ), 2,2-3,60 (observamos um conjunto de sinais largos que integram para, 20 H,  $N(CH_2)_2N$  e  $NCHaHbCH$ ), 3,72 (s, 3H,  $C(O)OCH_3$ ), 4,84 (m, 1H,  $NCHaHbCH$ ). RMN de <sup>1</sup>H (75,4 MHz,  $CDCl_3$ ): 14,07 ( $OCH_2CH_3$ ), 27,89 ( $C(CH_3)_3$ ), 50,85 (conjunto de sinais,  $CH_2$ ), 52,57 ( $OCH_3$ ), 55,01 ( $CH_2$ ), 55,58 ( $CH_2$ ), 55,88 ( $CH$ ), 56,43 ( $CH_2$ ), 57,00 ( $CH_2$ ), 58,26 ( $CH_2$ ), 60,52 ( $CH_2$ ), 61,14, 61,27, 61,52 ( $OCH_2$ ) 83,81 ( $C(CH_3)_3$ ), 152,01 ( $NC(O)O$ ), 173,60 ( $C(O)$ ). HRMS (ESI): m/z: calc para  $C_{34}H_{62}N_5O_{12}$ : 732,4395, obtido: 732,4398.

**Síntese do trietil 2,2',2''-(10-(2-amino-3-metoxi-3-oxopropil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triil)triacetato (22):** O composto (**21**) (851 mg, 1,12 mmol) foi dissolvido em 10 cm<sup>3</sup> de uma solução de 10% TFA. Ficou sob agitação à temperatura ambiente durante 3 horas. A solução foi concentrada sob pressão reduzida de modo a obter-se o sólido pretendido **22**.

**Síntese do trietil 2,2',2''-(10-(2-(5-(1,2-ditiolan-3-il)pentanamido)-3-metoxi-3-oxopropil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triil)triacetato (23):** O sólido **22** foi dissolvido em 20 cm<sup>3</sup> de diclorometano e adicionou-se DIPEA até pH > 7. Adicionou-se aproximadamente 1,2 equivalentes de Diciclohexilcarbodiimida (288 mg, 1,40 mmol), hidroxibenzotriazol (214 mg, 1,40 mmol) e de ácido lipoico (**19**) (288 mg, 1,40 mmol). Deixou-se a reacção sob agitação durante a noite. Concentrou-se a amostra sob pressão reduzida. Dissolveu-se em acetato de etilo, lavou-se com  $KHCO_3$ , brime e ácido cítrico. Concentrou-se a amostra sob pressão reduzida de modo a obter-se o composto pretendido (**16**) (358 mg, 0,49 mmol, 44,4%). RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$ =1,28 (m,



9H,  $\underline{\text{CH}_3}$ ), 1,48 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 1,70 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{CHCH}_2$ ), 1,93 (m, J= 7,65 Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 2,41 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 2,10-3,40 (observamos um conjunto de sinais largos que integram para 16 H,  $\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{N}$ ; 6H  $\text{CH}_2\text{C}(\text{O})$ ; 2 H  $\text{CH}_2$ ,  $\underline{\text{ABX}}$ ), 3,01 (m, 6H,  $\text{CH}_2\text{CHCH}_2$  e  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 3,54 (m, 1H,  $\text{C}(\text{O})\underline{\text{CH}_3}$ ), 3,57 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{CHCH}_2$ ) 4,19 (m, 6H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 4,71 (dd, J= 7,8 e 14,8 Hz, 1H,  $\underline{\text{ABX}}$ ).

**Síntese do  $\text{DO}_3\text{A-N-}\alpha$ -aminopropionato-Lipoamida (15):** O composto **23** (340 mg, 0,47 mmol) foi dissolvido em uma solução de 10  $\text{cm}^3$  de HCl 6 M e 10  $\text{cm}^3$  de etanol. Ficou sob agitação durante 16 horas à temperatura ambiente. O sólido obtido foi redissolvido em  $\text{H}_2\text{O}$  (15  $\text{cm}^3$ ) e a solução foi ajustada a pH 10-11 através da adição de porções de resina Dowex-1X2-100  $\text{OH}^-$  ( $\approx 20 \text{ cm}^3$ ). A reacção foi mantida sob agitação durante 1 hora à temperatura ambiente. Seguidamente, a resina foi colocada numa coluna lavada com  $\text{H}_2\text{O}$  e eluída com HCl 0,1 M foram recolhidas as fracções que apresentavam a presença de composto, identificadas através de TLC, e evaporadas a pressão reduzida para se obter o sólido pretendido (**15**) (243 mg, 0,39 mmol, 83%). RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$ = 1,46 (q, J= 7,8 Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 1,64- 1,72 (m, 6H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 2,01 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 2,34 (t, J= 7,5 Hz 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 2,49 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{CHCH}_2$ ), 2,10- 3,40 (observamos um conjunto de sinais largos que integram para 16 H,  $\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{N}$  e 8H  $\text{CH}_2\text{C}(\text{O})$ ), 4,49 (m, 1H, CH) . RMN de  $^{13}\text{C}$  (75,4 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ): 25,02 (1C,  $\underline{\text{CH}_2}$ ), 28,32 (1C,  $\underline{\text{CH}_2}$ ), 33,93 (1C,  $\underline{\text{CH}_2}$ ), 35,73 (1C,  $\underline{\text{CH}_2}$ ), 38,22 (1C,  $\underline{\text{CH}_2}$ ), 40,46 (2C,  $\underline{\text{CH}_2}$ ), 47,81 (3C,  $\underline{\text{CH}_2}$ ), 49,46 (1C,  $\underline{\text{CH}_2}$ ), 51,37 (1C,  $\underline{\text{CHCH}_2}$ ), 51,94 (2C,  $\underline{\text{CH}_2}$ ), 54,51 (2C,  $\underline{\text{CH}_2}$ ), 56,08 (2C,  $\underline{\text{CH}_2}$ ), 56,76 (2C,  $\underline{\text{CH}_2}$ ), 170,94 (1C,  $\text{C}(\text{O})$ ), 176,65 (2C,  $\text{C}(\text{O})$ ), 177,36 (2C,  $\text{C}(\text{O})$ ).

### 3.5.3 Estudos de caracterização das nanopartículas

*Método geral para a preparação de nanopartículas de ouro funcionalizadas com o agente quelante DOTA-Lipoamida pelo método de Brust*

A uma solução aquosa de ácido tetracloroaurico (0,5  $\text{cm}^3$ , 14,7  $\mu\text{mol}/\text{cm}^3$ ) adicionou-se sob agitação magnética o volume de solução aquosa do agente quelante DOTA-Lipoamida (14,7  $\mu\text{mol}/\text{cm}^3$ ) necessário para obter a razão molar Au:Ligando desejada. Após um a dois minutos adicionou-se um equivalente molar, em relação à quantidade de ouro, de uma solução aquosa de borohidreto de Sódio (130  $\mu\text{mol}/\text{cm}^3$ ).

A solução foi mantida sob agitação magnética à temperatura ambiente durante aproximadamente 24 horas. De seguida, a solução foi transferida para uma incubadora orbital e mantida sob agitação a 50 °C durante o tempo desejado.

*Método geral para a preparação de nanopartículas de ouro funcionalizadas com o agente quelante DO<sub>3</sub>A-N- $\alpha$ -aminopropionato-Lipoamida pelo método de Brust*

A uma solução aquosa de ácido tetracloroaurico (0,5 cm<sup>3</sup>, 7,6  $\mu$ mol/cm<sup>3</sup>) adicionou-se sob agitação magnética o volume de solução aquosa do agente quelante DO<sub>3</sub>A-N- $\alpha$ -aminopropionato-Lipoamida (7,6  $\mu$ mol/cm<sup>3</sup>) necessário para obter a razão molar Au:Ligando desejada. Após um a dois minutos adicionou-se um equivalente, em relação à quantidade de ouro, de uma solução aquosa de borohidreto de Sódio (70  $\mu$ mol/cm<sup>3</sup>). A solução foi mantida sob agitação magnética à temperatura ambiente durante aproximadamente 24 horas. De seguida, a solução foi transferida para uma incubadora orbital e mantida sob agitação a 50 °C durante o tempo desejado.

*Método geral para purificação de nanopartículas por filtração centrífuga*

As amostras foram transferidas para os *Centricones* (Centrifugal Filter Devices, Amicon Ultra – 4, Ultracel – 10K), e centrifugadas a 4500 rpm (2830 g) a 5 °C durante aproximadamente 15 minutos. A lavagem das nanopartículas foi removida do *Centricon* e a solução concentrada de nanopartículas (num volume final de aproximadamente 250  $\mu$ l) foi redissolvida em água destilada (3 cm<sup>3</sup>). Este processo foi repetido 3 a 4 vezes. A solução concentrada foi redissolvida com no volume de solvente desejado. A análise de metal livre, pelo método do alaranjado de Xilenol, nas lavagens de soluções de nanopartículas durante as experiências de complexação, permite avaliar a percentagem de complexação [28].

É ainda possível redissolver a amostra concentrada de nanopartículas em outros solventes, por exemplo em soluções tampão ou D<sub>2</sub>O para análise por espectroscopia de RMN.

*Método geral para a purificação de nanopartículas por cromatografia de exclusão em Sephadex G25*

Filtrou-se as amostras de nanopartículas através de um filtro com porosidade 0,2  $\mu\text{m}$ . *Empacotou-se* uma coluna de cromatografia de exclusão com Sephadex G25 - 300 em água. As amostras foram eluídas da coluna com água. As nanopartículas são eluídas no volume vazio da coluna. A recolha de diferentes fracções é guiada pela cor característica das nanopartículas de ouro (vermelho/castanho). Usando colunas de Sephadex G 25 - 300 *empacotadas* com soluções tampão e fazendo a eluição com a mesma solução permite obter as nanopartículas nessa solução tampão.

#### *Complexação com iões $\text{Ln}^{3+}$*

As nanopartículas funcionalizadas com os agentes quelantes DOTA-Lipoamida e  $\text{DO}_3\text{A-N-}\alpha$ -aminopropionato-Lipoamida foram complexadas com  $\text{Gd}^{3+}$ ,  $\text{Eu}^{3+}$  e  $\text{Sm}^{3+}$ .

As soluções de  $\text{Gd}^{3+}$ ,  $\text{Eu}^{3+}$  e  $\text{Sm}^{3+}$  com as concentrações desejadas foram preparadas por dissolução do respectivo sal ( $\text{LnCl}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ ) em água destilada. O número de equivalentes de metal foi calculado com base no número de moles de agente quelante usado na síntese das nanopartículas. Durante a adição da solução de metal o pH da solução de nanopartículas foi mantido constante, entre 5,0 e 5,5, pela adição de uma solução de NaOH (0,1 M). As amostras foram colocadas sob agitação a 50 °C durante 24 horas.

Alternativamente, às soluções concentradas de nanopartículas, diluídas com um volume igual de tampão acetato (0,4 M, pH 5,1), foi adicionada uma solução do sal do ião lantanídeo desejado ( $\text{LnCl}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ ) em água. A solução resultante foi colocada sob agitação a 50 °C durante 24 horas.

#### *Determinação do tamanho das partículas por DLS:*

O tamanho das nanopartículas funcionalizadas com os agentes quelantes DOTA-Lipoamida e  $\text{DO}_3\text{A-N-}\alpha$ -aminopropionato-Lipoamida, foi efectuado através da medição da dispersão de luz numa amostra de 1  $\text{cm}^3$ , numa cuvete com quatro faces ópticas, usando um instrumento ZETA NANOSIZER MALVERN.

#### *Determinação do cmc:*

A determinação do cmc do complexo  $\text{Gd}(\text{DOTA-Lipoamida})$  e o estudo da funcionalização das nanopartículas de ouro estabilizadas com citrato com o complexo

Gd(DOTA-Lipoamida), foi efectuado através da medição da contribuição paramagnética para os valores de  $R_1^p_{obs}$ , em função da concentração do complexo, usando um relaxómetro Bruker Minispec mq20 (20 MHz,  $B_0 = 0,47$  T,  $T = 25$  °C). A concentração do complexo Gd(DOTA-Lipoamida) variou entre 0,1 mM a 1 mM.

*Estudos de Biodistribuição:*

As experiências de biodistribuição foram realizadas no IBILI, Coimbra pela Doutora Isabel Prata.

A uma solução de nanopartículas de ouro funcionalizadas com o agente quelante  $DO_3A-N-\alpha$ -aminopropionato-Lipoamida, em tampão acetato (200  $\mu$ L, 0,4 M, pH 5,1), foi adicionado 250  $\mu$ L de uma solução de  $^{153}\text{SmCl}_3$  (700  $\mu$ Cu). A amostra foi purificada por cromatografia de exclusão molecular numa coluna de Sephadex G25 – 300 por eluição com tampão acetato. A fracção marcada foi injectada em Wistar rats e as biodistribuições obtidas ao fim de 2 e de 24 horas.

### 3.6 Referências

- [1] Caravan, P.; Ellison, J.J.; McMurry, T.J.; Lauffer, R.B. *Chem. Rev.*, **1999**, 99, 2293–2352.
- [2] Merbach, A.E.; Tóth, É. "*The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*", **2001**, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester.
- [3] Ferrari, M. *Nat. Rev. Cancer*, **2005**, 5, 161-171.
- [4] Sunderland, C. J.; Steiert, M.; Talmadge, J.E.; Derfus, A.M.; Barry, S.E. *Drug Dev. Res.*, **2006**, 67, 70-93.
- [5] Gao, X.; Cui, Y.; Levenson, R.M.; Chung, L.W.K. and Nie, S. *Nat. Biotechnol.*, **2004**, 22, 969-976.
- [6] Giersig, M.; Mulvaney, P. *Langmuir*, **1993**, 9, 3408-3413
- [7] Daniel, M.-C.; Astruc, D. *Chem. Rev.* **2004**, 104, 293-346
- [8] Alric, C.; Taleb, J.; Le Duc, G.; Mandon, C.; Billotey, C.; Le Meur-Herland, A.; Brochard, T.; Vocanson, F.; Janier, M.; Perriat, P.; Roux, S.; Tillement, O. *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130, 5908-5915
- [9] Debouttière, P.-J.; Roux, S.; Vocanson, F.; Billotey, C.; Beuf, O.; Favre-Régouillon, A.; Yi Lin; Pellet-Rostaing, S.; Lamartine, R.; Perriat, P.; Tillement, O., *Adv. Funct. Mater.*, **2006**, 16, 2330–2339
- [10] Park, J.-A.; Reddy, P.A.N.; Kim, H.-K.; Kim, I.-S.; Kim, G.-C.; Chang, Y.; Kim, T.-J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*; **2008**, 18 (6135–6137
- [11] Moriggi, L.; Cannizzo, C.; Dumas, E.; Mayer, C.R.; Ulianov, A.; Helm, L. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 10828–10829
- [12] Marradi, M.; Alcántara, D.; Fuente, J.M.; García-Martín, M.L.; Cerdán, S.; Penadés, S. *Chem. Commun.*, **2009**, 3922–3924
- [13] Chan, K.W.-Y.; Wong, W.-T. *Coordination Chemistry Reviews* **2007**, 251, 2428–2451
- [14] André, J.P.; Geraldes, C.F.G.C.; Martins, J.A.; Merbach, A.E.; Prata, M.I.M.; Santos, A.C.; de Lima, J.J.P.; and Tóth, E. *Chem. Eur. J.* **2004**, 10, 5804– 5816
- [15] Prata, M.I.M.; Santos, A.C.; Torres, S.; André, J.P.; Martins, J.A.; Neves, M.; García-Martins, M. L.; Rodrigues, T. B.; López-Larrubia, P.; Cerdán, S.; Geraldes, C.F.G.C. *Contrast Med. Mol. Imaging*, **2006**, 1, 246–258
- [16] Barge, A.; Tei, L.; Upadhyaya, D.; Fedeli, F.; Beltrami, L.; Stefanía, R.; Aime S.; Cravotto, G. *Org. Biomol. Chem.*, **2008**, 6, 1176–1184

- [17] Brown, S.E.; Ross, M.F.; Sanjuan-Pla, A.; Manas, A-R.B.; Smith, R.A.J.; Murphy, M.P. *Free Radical Biology & Medicine*, **2007**, 42, 1766–1780
- [18] Endo, K.; Yamanaka, T.; *Macromolecules*, **2006**, 39, 4038-4043
- [19] Turkevitch, J.; Stevenson, P. C.; Hillier, *Discuss. Faraday Soc.* **1951**, 11, 55-75.
- [20] Yonezawa, T.; Kunitake, T. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.* **1999**, 149, 193-199.
- [21] Mie, G. *Ann. Phys.* **1908**, 25, 377-445
- [22] Accardo, A.; Tesauro, D.; Aloj, L.; Pedone, C.; Morelli, Morelli, G. *Coordination Chemistry Reviews*, **2009**, 2193-2213
- [23] Torres, S.; Martins, J.A.; André, J.P.; Geraldes, C.F.G.C.; Merbach, A.E.; Tóth, E. *Chem Eur J.* **2006**, 12, 940-948
- [24] Zetasizer Nano Series - User Manual, *MAN0317 Issue 2.1*, **July 2004**
- [25] Logunov, S.L.; Ahmadi, T.S.; El-Sayed, M.A.; Khoury, J.T.; Whetten, R.L. *Electron J. Phys. Chem. B* **1997**, 101, 3713-3719
- [26] Papavassiliou, G.C. *Prog. Solid State Chem.* **1979**, 12, 185-271.
- [27] Sadauskas, E. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* **2009**, 5, 162–169
- [28] Prajsnar, D.; *Chem. Anal.*, **1963**, 8, 71–75.

